

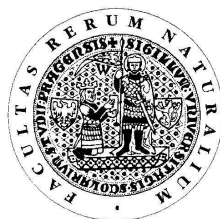
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Michal Havelka

STANOVENÍ NÍZKÝCH KONCENTRACÍ  
KATIONAKTIVNÍCH POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK VE  
VODÁCH TECHNIKOU PRŮTOKOVÉ INJEKČNÍ  
ANALÝZY SE SPEKTROFLUORIMETRICKOU DETEKCÍ

Determination of Low Concentrations of Cationactive  
Tenzides in Water Samples using Flow Injection Analysis  
Technique with Spectrofluorimetric Detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

Praha 2012

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. srpna 2012

.....

Michal Havelka

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval vedoucímu své magisterské práce panu doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. za skvělé vedení a lidský přístup. Dále bych chtěl poděkovat panu RNDr. Václavovi Červenému, Ph.D. a panu RNDr. Jakubovi Hraníčkovi, Ph.D. za jejich cenné rady a ochotu.

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vypracováním citlivého stanovení kationaktivních tenzidů ve vodách pomocí průtokové injekční analýzy s spektrofotometrickou detekcí. Principem stanovení je interakce kationaktivních tenzidů se sodnou solí 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetrajodofluoresceinu (Bengálská červeň) za vzniku ve vodě rozpustného asociátu. Sodná sůl tetrachloro-tetrajodofluoresceinu je fluorescenčně aktivní; při stanovení kationaktivních tenzidů se detekuje pokles intenzity fluorescence barviva v důsledku vzniku fluorescenčně neaktivního asociátu. Vývoj stanovení probíhal ve dvou fázích.

Nejprve byla vypracována dávková metoda stanovení kationaktivních tenzidů. Jako standard kationaktivních povrchově aktivních látek byl vybrán cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) a N-( $\alpha$ -karbethoxypentadecyl)trimethyl ammonium bromid (Septonex). Byla nalezena optimální koncentrace barviva ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l), bylo určeno vhodné pH (pH = 9) a vhodný pufr (25 mM fosfátový pufr) pro stanovení. Lineární dynamický rozsah stanovení (Septonex) byl zjištěn v intervalu: mez stanovitelnosti -  $7 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Mez stanovitelnosti byla  $3,72 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

V další fázi byla navržena a sestavena aparatura pro průtokovou injekční analýzu se dvěma kanály. Byly optimalizovány podmínky pro průtokové stanovení (délka reakční cívky 60 cm, objem dávkovací smyčky 250  $\mu$ l, průtoková rychlosti 2,6 ml/min pro Bengálskou červeň a 3,1 ml/min pro deionizovanou vodu). Zjištěný lineární dynamický rozsah byl mez stanovitelnosti- $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l (Septonex i CTAB). Mez stanovitelnosti v průtokovém uspořádání byla  $5,41 \cdot 10^{-6}$  mol/l (CTAB) a  $9,26 \cdot 10^{-6}$  mol/l (Septonex).

Navržená metoda byla testována na stanovení kationaktivních tenzidů v pitné vodě metodou spikovaných vzorků.

## ***Klíčová slova***

Tenzidy

Fluorescence

Spektrofotometrická detekce

Průtoková injekční analýza, FIA

Bengálská červeň

Septonex

CTAB

## ABSTRACT

This thesis was focused on a development of sensitive determination of cationactive tenzides by using the flow injection analyses with spectrofluorimetric detection. The determination was based on an interaction of cationactive tenzides with sodium salt of 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein dye (Bengal red) that generates a soluble associate in water environs. The sodium salt of 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein is a fluorescence-active compound. A decrease of fluorescence intensity is detected as a result of the formation of fluorescence-inactive associate. A development of the determination proceeded in two steps.

At first a static method of the determination was developed. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and N-( $\alpha$ -karbethoxypentadecyl)trimethyl ammonium bromide (Septonex) were used as a standard for cationactive tenzides. An optimal theoretical concentration of Bengal red dye ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) was found, an optimum rate of pH for the fluorescence of Bengal red dye (pH = 9) was found, and a suitable kind of buffer for the environs of the interactions (25 mM phosphate buffer) was found. A linear dynamic range for the determination (Septonex) was in the interval: the limit of quantification -  $7 \cdot 10^{-5}$  mol/l. The limit of quantification was  $3,72 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

Next a device for the flow injection analyses with two canals was developed. The conditions of the determination were optimized (reaction coil length 60 cm, volume of dosing loop 250  $\mu$ l, flow rate of the canal with Bengal red 2,6 ml/min, flow rate of the canal with deionized water 3,1 ml/min). A linear dynamic range was in the interval: the limit of quantification -  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l (Septonex and CTAB). The limit of quantification was  $5,41 \cdot 10^{-6}$  mol/l (CTAB) and  $9,26 \cdot 10^{-6}$  mol/l (Septonex).

Finally the developed method was tested on the cationactive tenzides determination by using spiked samples of drinking water.

## Keywords

Tenzides

Fluorescence

Spectrofluorimetric detection

Flow injection analysis, FIA

Bengal red

Septonex

CTAB

## Seznam zkratek a symbolů

RB	barvivo Bengálská červeň (Bengal red)
FIA	průtoková injekční analýza
$U_F$	napětí na fotonásobiči detektoru [V]
$v_S$	rychlost skenu spektrometru [nm/s]
$\lambda_{exc}$	excitační vlnová délka [nm]
$\lambda_{em}$	emisní vlnová délka [nm]
$v_{FSV}$	průtoková rychlost peristaltické pumpy Masterflex [ml/min]
$v_{FSM}$	průtoková rychlost peristaltické pumpy C.P. 78017-20 [ml/min]
$L_C$	délka reakční cívky [cm]
$V_S$	objem dávkovací smyčky [ $\mu$ l]

## Obsah

1. Cíl diplomové práce.....	10
2. Teoretická část .....	11
2.1 Princip fluorescence molekul.....	11
2.1.1 Historie užití molekulové fluorescence .....	11
2.1.2 Luminiscence .....	11
2.1.3 Nezářivá relaxace.....	12
2.1.4 Fluorescence .....	13
2.1.5 Fosforescence.....	13
2.1.6 Excitační a emisní spektra .....	14
2.2 Zhášení a další jevy provázející molekulovou fluorescenci .....	15
2.2.1 Dynamické zhášení .....	15
2.2.2 Statické zhášení.....	16
2.2.3 Další jevy provázející fluorescenci.....	16
2.3 Veličiny charakterizující molekulovou fluorescenci .....	18
2.4 Metody fluorescenční spektrometrie .....	18
2.4.1 Molekulová fluorescenční spektrometrie.....	18
2.4.2 Laserem indukovaná fluorescence, laserem indukovaná fluorimetrická detekce .....	20
2.5 Užití molekulové fluorescenční spektroskopie a spektrometrie .....	21
2.6 Zdroje excitačního záření pro fluorescenční spektrometrii .....	24
2.6.1 Laserové zdroje.....	24
2.6.2 Výbojky .....	24
2.7 Detektory fluorescenčního záření - optoelektronická zobrazovací zařízení .....	25
2.7.1 Fotonásobiče .....	25
2.7.2 SIT snímací elektronka .....	26
2.7.3 Detektory s diodovým polem.....	27
2.8 Tenzidy – povrchově aktivní látky .....	28
2.8.1 Vymezení pojmu tenzid .....	28
2.8.2. Mechanismus čistících účinků tenzidů .....	29
2.8.3 Klasifikace tenzidů.....	29
2.8.4 Tenzidy a spektrofluorimetrie.....	31
2.9 Analytické metody užitečné ke stanovení tenzidů .....	31

2.9.1 Sekvenční injekční analýza.....	31
2.9.2 Průtoková injekční analýza .....	33
2.9.3 Rovnovážná potenciometrie .....	36
2.10 Analytické metody užitečné k separaci tenzidů .....	36
2.10.1 Vysocúčinná kapalinová chromatografie .....	36
2.10.2 Extrakce L-L .....	37
3. Experimentální část.....	38
3.1 Použité chemikálie .....	38
3.2 Použité přístroje a zařízení.....	38
3.3. Statické experimentální uspořádání pro vývoj metody stanovení kationaktivních tenzidů.....	39
3.4 Průtokové experimentální uspořádání pro stanovení kationaktivních tenzidů průtokovou injekční analýzou.....	40
3.5 Použitý software .....	40
4. Výsledková část a diskuze .....	42
4.1 Dávkové stanovení kationaktivních tenzidů reakcí s barvivem Bengálská červeň .....	42
4.1.1. Příprava zásobního roztoku barviva Bengálská červeň .....	42
4.1.2 Excitační spektrum barviva Bengálská červeň .....	42
4.1.3 Emisní spektrum barviva Bengálská červeň.....	43
4.1.4 Optimalizace experimentálních podmínek stanovení tenzidů reakcí s barvivem RB .....	44
4.1.5 Kalibrační závislost stanovení kationaktivního tenzidu Septonex .....	47
4.1.6 Základní charakteristiky vyvíjené metody stanovení Septonexu v dávkovém uspořádání.....	48
4.1.7 Kalibrační závislost stanovení kationaktivního tenzidu CTAB.....	49
4.2 Průtokové stanovení kationaktivních tenzidů .....	50
4.2.1 Optimalizace průtokových experimentálních podmínek stanovení.....	51
4.2.2 Objem dávkovaného vzorku .....	52
4.2.3 Optimalizace délky reakční cívky.....	52
4.2.4 Optimalizace průtokové rychlosti obou kanálů .....	53
4.2.5 Optimalizace jednotlivých průtokových rychlostí kanálů .....	54
4.2.6 Vliv koncentrace RB v pufru .....	55
4.2.7 Výsledné optimální podmínky pro FIA stanovení kationaktivních tenzidů ..	56



4.2.8 Kalibrační závislost stanovení CTAB.....	56
4.2.9 Kalibrační závislost stanovení CTAB (vyšší napětí na fotonásobiči) .....	57
4.2.10 Základní charakteristiky stanovení CTAB v průtokovém uspořádání FIA .	58
4.2.11 Kalibrační závislost stanovení Septonexu ve FIA uspořádání.....	59
4.2.12 Základní charakteristiky stanovení Septonexu v průtokovém uspořádání FIA .....	59
4.3 Stanovení koncentrace kationaktivních tenzidů v pitné vodě metodou FIA .....	60
5. Závěr .....	62
6. Seznam použitých zdrojů.....	63

## 1. Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat citlivé stanovení kationaktivních tenzidů ve vodách za pomoci průtokové injekční analýzy s fluorimetrickou detekcí.

Samotné kationaktivní tenzidy nejsou fluorescenčně aktivní. Cílem práce proto bylo nejdříve při statických měřeních nalézt vhodné fluorescenční barvivo, jehož intenzita fluorescence bude ovlivňována přítomností tenzidů v podobě zhášení nebo naopak zvýšení intenzity fluorescence.

Dalším cílem práce bylo při statických měřeních nalézt optimální experimentální podmínky pro provádění stanovení, provést kalibraci a určit základní charakteristiky vyvíjené metody stanovení.

Dalším cílem práce pro realizaci průtokového stanovení kationaktivních tenzidů bylo navrhnout a sestavit vhodnou aparaturu pro FIA, optimalizovat opět reakční podmínky, provést kalibraci a určit základní charakteristiky vyvíjené metody stanovení.

Konečným cílem této diplomové práce bylo vyzkoušet vyvíjenou metodu pro stanovení kationaktivních tenzidů ve vzorku pitné vody.

## **2. Teoretická část**

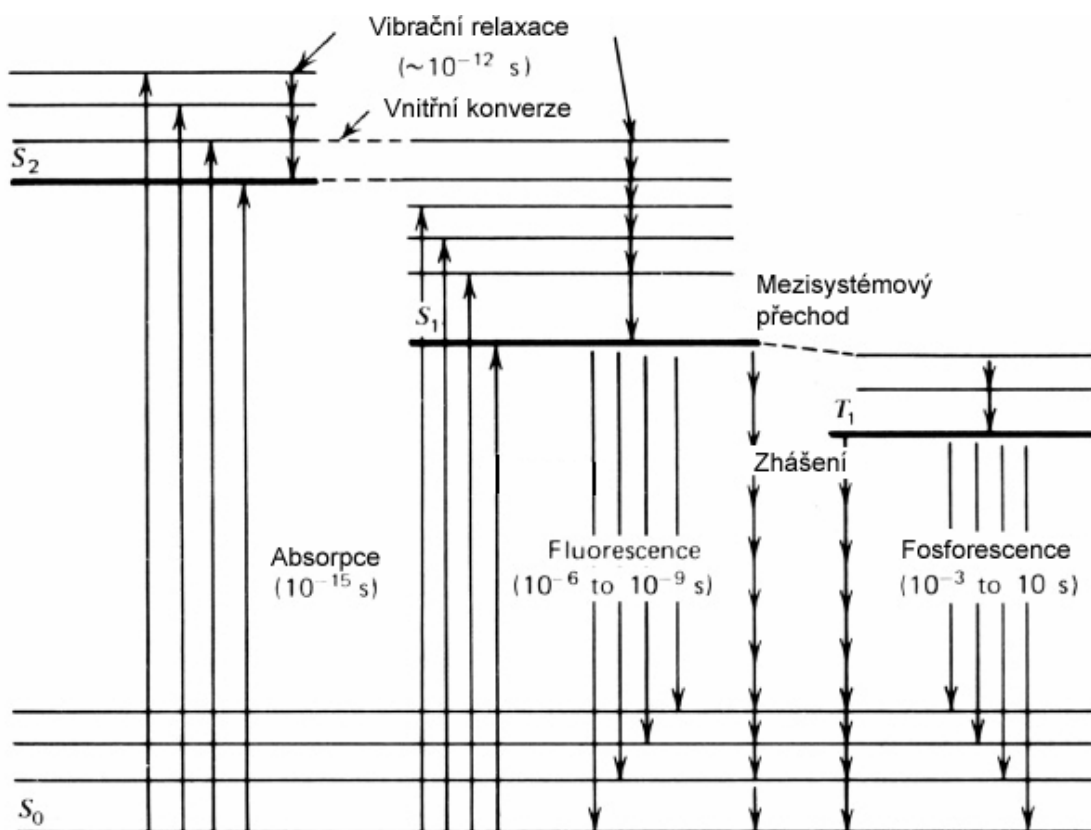
### **2.1 Princip fluorescence molekul**

#### **2.1.1 Historie užití molekulové fluorescence**

Počátek užití molekulové fluorescence pro kvalitativní analýzu může být vysledován k polovině 19. století. Přesné metody pro kvantitativní stanovení analytů se objevují ve 20-tých letech 20. století. Vybavení pro fluorescenční spektroskopii využívající filtrů a monochromátorů pro selekci příslušných vlnových délek začalo být užíváno ve 30-tých až 50-tých letech 20. století. Přestože objev fosforescence předcházela objevu fluorescence o více než 200 let, po vývoji instrumentace pro metody využívající molekulární fluorescence si kvalitativní a kvantitativní aplikace metod využívajících molekulární fosforescenci nezískala příliš pozornosti<sup>1</sup>.

#### **2.1.2 Luminiscence**

*Luminiscence* je jev, při kterém dochází k emisi záření poté, co je daná látka převedena do elektronově excitovaného stavu<sup>2</sup>. Většina molekul látek, které absorbují energii záření v UV/VIS oblasti, předává získanou energii při kolizi ostatním částicím<sup>3</sup>. Ve spoustě případů však kolizemi nedojde k předání veškeré získané energie a zbylá část energie je vydána ve formě luminiscenčního záření. Podle povahy tohoto excitovaného stavu rozlišujeme dva druhy luminiscence – fluorescenci a fosforescenci. Na energetické hladiny elektronových přechodů fluorescence a fosforescence molekul navazují molekulární energetické vibrační hladiny. Oba jevy lze znázornit pomocí tzv. Jablonského diagramu (*obrázek 1*).



Obrázek 1: Jablonskiho diagram

### 2.1.3 Nezářivá relaxace

Nezářivou deaktivací (*Radiationless deactivation*) nazýváme jev, kdy se molekula v excitovaném stavu zbavuje získané energie jinými cestami než přechodem mezi jednotlivými elektronovými hladinami. Tyto jevy tedy probíhají za stejného elektronového stavu (obrázek 1). Pro jev fluorescence a fosforescence mají zásadní význam přechody elektronové a vibrační.

Při *vibrační relaxaci* (*vibrational relaxation*) přechází molekula z excitovaného vibračního energetického stavu na nižší vibrační energetickou hladinu, beze změny elektronové energetické hladiny. Jedná se o rychlý proces, molekula vydrží na excitované vibrační energetické hladině  $10^{-12}$  a méně sekund<sup>1</sup>.

Jinou formou nezářivé relaxace (nezářivé deaktivace) je *vnitřní konverze* (*internal conversion*), kdy molekula na základní vibrační hladině při excitovaném elektronovém stavu přechází přímo na nižší elektronovou hladinu při zachování orientací spinu jejích elektronů a současně na vyšší vibrační hladinu. Při kombinacích jevu vnitřních konverzí a vibrační relaxace se může vrátit molekula v excitovaném energetickém stavu na základní elektronovou hladinu bez vyzáření fotonu<sup>1</sup>.

Příbuzným jevem k nezářivé relaxaci je *vnější konverze (external conversion)*, při které je získaná energie molekuly interakcemi přenesena na molekulu rozpouštědla nebo jinou molekulu v roztoku zkoumaného analytu<sup>1</sup>.

Vrcholnou podobou nezářivého přechodu je *mezisystémový přechod (intersystem crossing)*, při kterém molekula na základní vibrační energetické hladině při excitovaném elektronovém stavu molekuly přechází na nižší elektronovou energetickou hladinu při současném přechodu na vyšší vibrační energetickou hladinu, přičemž dojde také ke změně spinu elektronů molekuly (*obrázek 1*). Dojde ke změně singletového excitovaného elektronového stavu ( $S_1$ ) na tripletový excitovaný elektronový stav ( $T_1$ )<sup>1</sup>.

## 2.1.4 Fluorescence

Zářením excitovaná molekula koná kolize s molekulami v jejím okolí a zbavuje se nezářivými přechody svojí energie, přechází na nižší vibrační hladiny při zachování stejného elektronového excitovaného stavu. Molekuly okolního prostředí nemusí být schopny přijmout vyšší množství energie odpovídající přechodu zářením excitované molekuly do základního stavu. Pokud je k tomuto jevu dost času, zářením excitovaná molekula spontánně vyzáří foton fluorescenčního záření a koná fluorescenci<sup>4</sup>.

V základním energetickém stavu dané látky (její molekuly) se oba její elektrony nacházejí ve stejném orbitalu a mají opačně orientované spiny (singletový stav, stav  $S_0$ ). Při excitaci dané látky přechází jeden z těchto elektronů v molekulovém orbitalu na vyšší energetickou hladinu. V případě fluorescence se jedná o excitovaný opět singletový stav (stav  $S_1$ )-součet spinových kvantových čísel ( $s$ ) je roven 0, elektron na vyšší energetické hladině má spin opačně orientovaný ve vztahu k elektronu v orbitalu na základní energetické hladině. Tento získaný kvantový stav molekuly trvá po velmi krátkou dobu, řádově  $10^{-7}$  až  $10^{-8}$  s. Návrat druhého elektronu na původní energetickou hladinu je spinově povolený, dojde k vyzáření fotonu fluorescenčního záření (*obrázek 1*).

## 2.1.5 Fosforescence

První fáze fosforescence má podobný průběh jako fluorescence. Liší se však tím, že elektron na vyšší energetické hladině získá stejný spin jako elektron v základní energetické hladině, z níž excitovaný elektron vzešel. Dokud nezíská elektron nezářivým přechodem původní opačně orientovaný spin, nemůže se vrátit na výchozí elektronovou energetickou hladinu, za vyzáření fotonu fosforescenčního záření<sup>4</sup>.

K fosforescenci dochází, pokud má elektron, který je zdrojem fosforescence, po přechodu na vyšší energetickou hladinu stejně orientovaný spin jako elektron

v základním stavu. Souhlasně orientovaný spin získá v rámci tzv. *interkombinační konverze* nežádoucím přechodem<sup>3</sup> (*mezisystémovým přechodem*). Pak hovoříme o tripletovém stavu molekuly (stav  $T_1$ ) - součet spinových kvantových čísel obou elektronů je roven jedné. Tento stav trvá u molekuly relativně dlouho, přibližně od  $10^{-4}$  s do  $10^4$  s<sup>3,1</sup>. Fosforescence tedy může pokračovat nějakou dobu po odstranění zdroje excitačního záření<sup>1</sup>. Obecně platí, že kvantový stav molekuly  $T_1$  má nižší energii než stav  $S_1$ <sup>3</sup>. Návrat tohoto elektronu na původní energetickou hladinu je spinově zakázaný do té doby, než získá původní spin, opačně orientovaný ve vztahu k druhému z elektronů. Poté, co ho získá, se vrací na původní energetickou hladinu za vyzáření fotonu (*obrázek 1*).

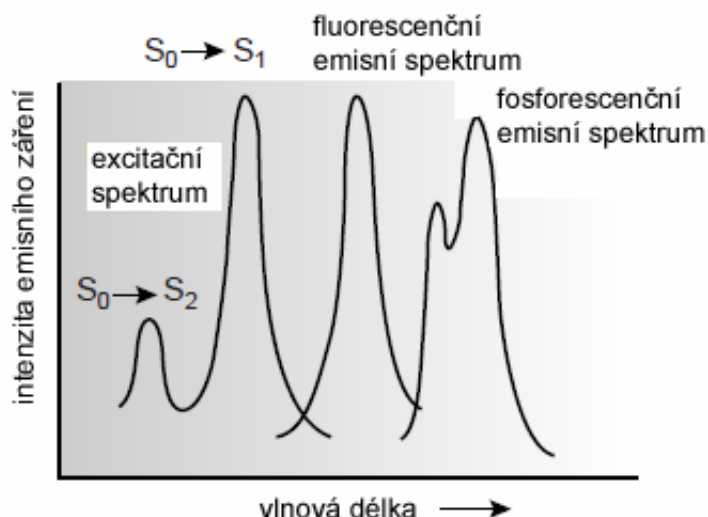
Pokud dojde k přechodu do stavu  $S_0$  kolizní deaktivací, nebude fosforescence pozorována<sup>3</sup>.

Fluorescence je jev charakteristický pro molekuly obsahující aromatická jádra<sup>2</sup>. Absorpci energie excitačního záření na aromatickém jádře zajišťuje zpravidla jeden z elektronů jeho  $\pi$  orbitalu. Jako příklad lze uvést chinin, fluorescein, rhodamin B<sup>2</sup>.

### 2.1.6 Excitační a emisní spektra

Fotoluminiscenční (fluorescenční a fosforescenční) spektra jsou získávány měřením intenzity emisního záření jako funkce buď excitační nebo emisní vlnové délky<sup>1</sup>.

U látek konajících fluorescenci můžeme proměřovat tzv. *excitační (aktivační) spektra*. Excitační spektrum získáme tak, že monitorujeme intenzitu emisního záření při dané vlnové délce (odpovídající emisnímu maximu dané molekuly) při postupně měněné excitační vlnové délce<sup>1</sup>. Získané excitační spektrum se podobá absorpčnímu spektru dané molekuly, ale nebývá s ním zcela totožné<sup>3</sup>. Proměrování excitačních spekter nám poskytuje vhodný způsob, jak nalézt vhodnou excitační vlnovou délku pro kvantitativní nebo kvalitativní analýzu. *Emisní spektrum* získáme tak, že při nastavené excitační vlnové délce monitorujeme intenzitu emitovaného záření v závislosti na nastavení vlnové délky emisního monochromátoru. Molekula analytu má obecně jedno excitační spektrum a dvě emisní spektra; jedno příslušící fluorescenci a druhé fosforescenci<sup>1</sup>. Charakteristiku všech tří druhů spekter přináší *obrázek 2*.



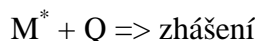
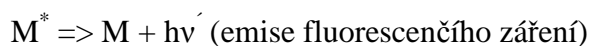
Obrázek 2: Excitační, fluorescenční a fosforescenční spektra

## 2.2 Zhášení a další jevy provázející molekulovou fluorescenci

Zhášení fluorescence (*fluorescence quenching*) je jev, v jehož důsledku dochází ke snižování intenzity záření fluorescence<sup>2</sup>. Ke zhášení může dojít v důsledku různých mechanismů, například na základě kolizí molekul zhášedel (quenchers) s fluoreskujícími molekulami v excitovaném stavu. Pak hovoříme o *dynamickém zhášení*, *zhášení kolizemi* (*Dynamic Quenching*, *Collisional Quenching*). Zhášedly mohou být (podle druhu fluoreskující molekuly) například rozpuštěné molekuly kyslíku O<sub>2</sub>, ionty I<sup>-</sup>, Cs<sup>+</sup> nebo akrylamid<sup>5</sup>.

### 2.2.1 Dynamické zhášení

Proces fluorescence a zhášení prostřednictvím kolizí můžeme demonstrovat na následujících ilustrativních rovnicích:



kde M je molekula konající fluorescenci a Q je molekula zhášedla

Proces dynamického (kolizního) zhášení lze popsat pomocí vztahu:

$$F_0/F - 1 = K_{SV} \cdot [Q]$$

kde  $F_0$  a  $F$  jsou intenzity fluorescenčního záření v nepřítomnosti a přítomnosti zhášedla,  $[Q]$  je koncentrace zhášedla a  $K_{SV}$  je Stern-Volmerova konstanta zhášení (Stern-Volmer quenching constant).

### 2.2.2 Statické zhášení

Molekuly zhášedla mohou rovněž vytvořit s fluoreskující molekulou komplex. Tento komplex pak není schopen konat fluorescenci. Pak hovoříme o *statickém zhášení* (*Static Quenching*).



Proces statického zhášení lze popsat pomocí vztahu:

$$F_0/F = 1 + K_a \cdot [Q]$$

kde  $K_a$  je slučovací konstanta pro daný komplex (association constant of the complex),  $[Q]$  je koncentrace zhášedla a  $F_0$  a  $F$  jsou intenzity fluorescenčního záření v nepřítomnosti a přítomnosti zhášedla<sup>5</sup>.

V případě, kdy se v roztoku kombinují oba procesy zhášení, lze jeho chování popsat pomocí vzorce:

$$F_0/F = (1 + k_q\tau[Q]) (1 + K_a[Q])$$

kde  $F_0$  a  $F$  jsou intenzity fluorescenčního záření v nepřítomnosti a přítomnosti zhášedla,  $k_q$  je konstanta zhášení obou molekul zhášedla (the bimolecular quenching rate constant),  $[Q]$  je koncentrace zhášedla,  $K_a$  je slučovací konstanta pro daný komplex (association constant of the complex),  $\tau$  je čas fluorescence (lifetime of fluorescence)-časový rozdíl mezi absorpcí excitačního a počátkem emise fluorescenčního záření<sup>5</sup>.

### 2.2.3 Další jevy provázející fluorescenci

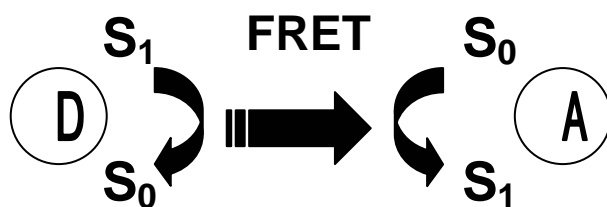
Změna teploty roztoku, který analyzujeme, s sebou obvykle přináší změnu naší měřené intenzity fluorescenčního záření, přibližně o několik procent na stupeň změny teploty. Za nízkých teplot dosahujeme fluorescenčního maxima, za vysokých teplot může fluorescence v krajním případě vymizet<sup>6</sup>. Děje se tak na základě nejrůznějších faktorů, energetické změny v excitované molekule nastávají např. v důsledku tepelného pohybu částic v roztoku. Uplatňují se přitom nezářivé intramolekulární a mezimolekulární deaktivací procesy.



Změna naměřené intenzity fluorescenčního záření je celkově spjata se změnami v prostředí samotného rozpouštědla. Významně se uplatňují například interakce vodíkových vazeb, změny ve stupních disociace, skupiny částic odvozených od oxoniových kationtů v prostředí roztoků silných kyselin oxidů síry. Tyto interakce napomáhají konkrétním nežádoucím intramolekulárním a mezimolekulárním deaktivacím procesům. V důsledku omezení těchto vlivů pak mají nepolární sloučeniny v prostředí nepolárních rozpouštědel vyšší kvantový výtěžek fluorescence (viz. níže). V prostředí rozpouštědel se snáze polarizovatelnými molekulami (např. v důsledku van der Waalsových interakcí) pak snáze dochází k zhášení fluorescence<sup>6</sup>.

Při fluorescenci je energie emitovaného záření nižší než energie absorbovaného excitačního záření<sup>2</sup>. Emitované fluorescenční záření má tedy delší vlnovou délku než záření excitační. Tento jev byl poprvé pozorován sirem G.G. Stokesem v roce 1852<sup>2</sup> a nazývá se po něm *Stokesův posun* (*Stoke's shift*).

*Fluorescenční rezonanční energetický přenos* (*Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*) je jev, při kterém dochází k přenosu energie z jedné molekuly v excitovaném stavu (donor) na jinou molekulu (akceptor) (*obrázek 3*). Při přenosu dojde k zvýšení energetického stavu elektronů akceptoru na úkor poklesu energetického stavu elektronů donoru, samotný mechanismus přenosu energie mezi molekulami nezahrnuje emisi záření. K FRET dochází na základě interakcí dipól–dipól mezi molekulami donoru a akceptoru<sup>5</sup>, odehrává se na relativně velkých vzdálenostech–15 až 60 Å<sup>2</sup>.



*Obrázek 3: Fluorescenční rezonanční energetický přenos*

## 2.3 Veličiny charakterizující molekulovou fluorescence

*Kvantový výtěžek fluorescence (Quantum Yield, QY)* v analyzovaném prostředí lze vyjádřit jako podíl počtu emitovaných fotonů fluorescenčního záření ku počtu všech absorbovaných fotonů excitačního záření. Lze jej rovněž popsat pomocí koeficientů charakterizujících jednotlivé elektronové přechody.

$$QY = k_m / (k_m + k_i + k_x)$$

kde  $k_m$  je koeficient charakterizující fluorescence (rate of fluorescence),  $k_i$  je konstanta charakterizující nezářivé přechody (rate of radiationless decay) a  $k_x$  je konstanta charakterizující mezisystémový přechod (rate of intersystem crossing)<sup>5</sup>.

*Čas fluorescence (Lifetime of fluorescence,  $\tau$ )* je časový rozdíl mezi absorpcí excitačního a počátkem emise fluorescenčního záření. Lze jej popsat pomocí koeficientů charakterizujících jednotlivé elektronové přechody.

$$\tau = 1 / (k_M + k_{nr})$$

kde  $k_M$  je konstanta specifická pro daný chromofor (nature constant for each chromophore),  $k_{nr}$  je součet konstant charakterizujících nezářivé přechody (sum of kinetic constants of all non-radiative process)<sup>5</sup>.

*Doba trvání fluorescence (Fluorescence lifetime,  $t$ )* je doba, za kterou poklesla intenzita záření na hodnotu  $1/e$  intenzity záření populace na počátku fluorescence.

Intenzitu záření lze vyjádřit pomocí vztahu.

$$I_t = \alpha \cdot e^{-t / \tau}$$

kde  $I_t$  je intenzita záření v čase  $t$  (intensity at time  $t$ ),  $\alpha$  je tzv. normalizační člen (normalization term) a  $\tau$  je čas fluorescence (lifetime of fluorescence)<sup>5</sup>.

## 2.4 Metody fluorescenční spektrometrie

### 2.4.1 Molekulová fluorescenční spektrometrie

Základní konstrukce aparatur pro metody molekulové fluorescenční spektrometrie (fluorimetrie) a molekulové fosforescenční spektrometrie je podobná konstrukci aparatur pro molekulovou absorpční spektroskopii. Některé přístroje mají dva režimy měření – pro měření molekulární absorpce a pro měření molekulární fluorescence (a také fosforescence)<sup>1</sup>.

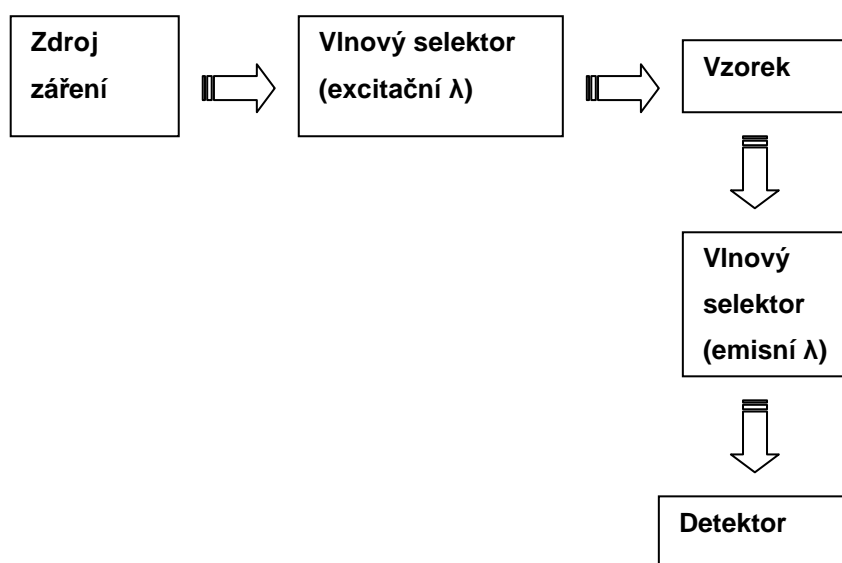
Konstrukční schéma typické aparatury pro fluorimetrii je na *obrázku 4*. Na rozdíl od metody molekulové absorpční spektrometrie, detektor záření a zdroj záření jsou ve

vztahu k dráze šíření zdrojového paprsku obvykle orientovány vůči sobě v úhlu  $90^\circ$ . Existují dvě základní konstrukční řešení pro měření molekulové fluorescence<sup>1</sup>.

V případě *flourimetru* jsou excitační a emisní vlnové délky záření vymezeny absorpčními nebo interferenčními filtry. Zdrojem excitačního záření pro fluorimetr bývá obvykle nízkotlaká rtuťová výbojka. Ta vyzařuje intenzivní emisní čáry rozložené napříč ultrafialovým a viditelným spektrem (254, 312, 356, 405, 436, 546, 577, 691 a 773 nm).

Pokud je jako selektor excitačních a emisních vlnových délek použit monochromátor, nazýváme takový přístroj *spektrofluorimetr*. Pokud je použit monochromátor, užívá se obvykle jako zdroj excitačního záření vysokotlaká xenonová výbojka. Ta vyzařuje spojité spektrum.

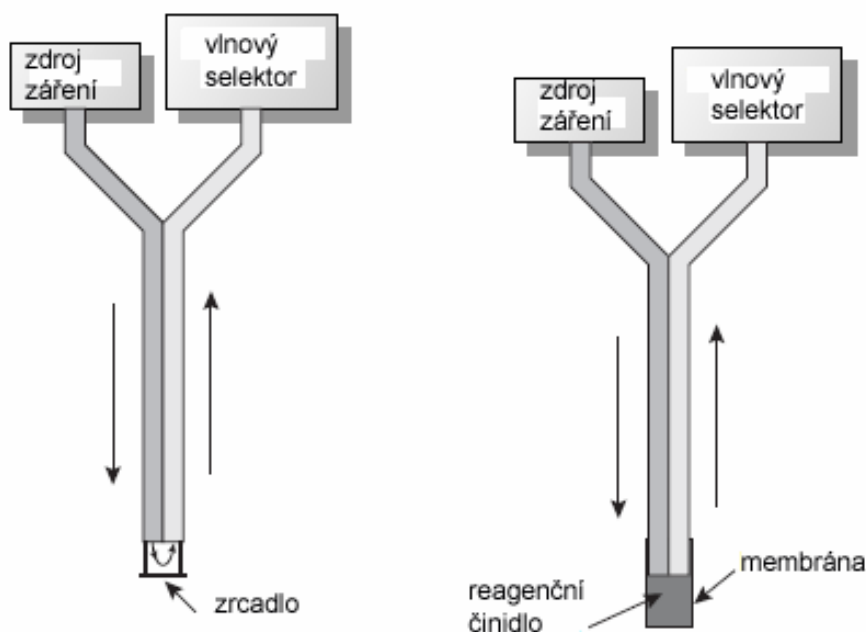
Pro měření molekulární fluorescence se používají ty samé skleněné kyvety jako pro měření molekulové absorpce. Křemenné kyvety se používají pro práci s excitačním zářením o vlnové délce pod 300 nm<sup>1</sup>.



Obrázek 4: Konstrukční schéma aparatury pro spektrofluorimetrii

Zejména pro aplikace na živé vzorky může být použito dálkové snímání na bázi sond s optickými vlákny (*fiber-optic probe*), tzv. *optrody* (obrázek 5). Pak hovoříme o analýze vzorků in-situ. Sonda je vybavena dvěma oddělenými svazky optických vláken. Jeden svazek propouští záření od zdroje do speciální kyvety, která umožňuje snadný průtok roztoku se vzorkem skrz její propustné stěny. Záření prochází roztokem, po průchodu skrz vzorek až ke dnu kyvety je odraženo zrcadlovou vrstvou zpět. Druhý svazek optických vláken propouští neabsorbované záření, směrem k vlnovému

selektoru. Stěny kyvety mohou obsahovat pro průtok roztoku se vzorkem výřezy nebo také membránu s příslušnou fází, schopné reakce s analytem. V takovém případě se vytváří při difundování skrz membránu produkt, který absorbuje UV záření nebo viditelné záření. Pro analýzu nefluoreskujících látek může být na okraje optických vláken nanесena sonda v podobě molekul schopných fluorescence. Jejich reakce s analytem pak může snížit nebo zvýšit výslednou intenzitu fluorescenčního záření<sup>1</sup>.



Obrázek 5: Optrody

## 2.4.2 Laserem indukovaná fluorescence, laserem indukovaná fluorimetrická detekce

*Laserem indukovaná fluorescence (LIF)* molekul je základem pro nejcitlivější analytické metody. Extrémně monochromatické laserové záření je schopné vstupovat do interakce s jediným absorpčním přechodem a excitovat tak jedinou energetickou hladinu molekuly. Proces excitace molekuly je tak mimořádně účinný. Výsledkem excitace jsou (ve srovnání s buzením fluorescence pomocí výbojky) jednoduchá a přehledná spektra. Budící záření bývá obvykle v ultrafialové oblasti<sup>7</sup>. Pro správné měření fluorescence se má vlnová délka excitačního záření produkovaného laserem co nejvíce přibližovat vlnové délce excitačního maxima dané částice, proto bývají sledované molekuly či ionty fluorescenčně značeny (např. pomocí tzv. fluorescenčních sond).

Při laserem indukované fluorescenci je nutné zabránit všem procesům vedoucím k nezářivé relaxaci molekuly. Je vhodné přivádět vzorek v minimálním množství v podobě molekulového svazku, případně uzavřít vzorek do kyvety společně s molekulami nárazníkového plynu. Při zavádění vzorku do kyvety je vhodné směřovat laserové záření na rovinu, v níž leží molekulový svazek, pod co nejmenším úhlem, čímž získáváme co nejdelší dráhu pro absorpci laserového záření. Je vhodné, aby pro správnost výsledků detekovaná molekula prošla procesem absorpce excitačního záření/fluorescence vícekrát<sup>7</sup>.

Mimořádně krátké délky laserových pulzů umožňují sledovat fluorescenční spektrum v čase (tzv. časově rozlišitelná spektroskopie), získat časově rozlišitelné údaje a postupně sledovat fluorescenční dohasínání. Rozvinutím časové závislosti lze získat trojrozměrné spektrum: amplituda fluorescenčního záření/vlnová délka/čas<sup>7</sup>.

Metoda laserem indukované fluorescence umožňuje v ideálním případě dosáhnout nebo se přiblížit k limitu detekce jediné molekuly. Při ultrastopové analýze limitních množství analytu je nutné minimalizovat ztráty excitačního a fluorescenčního záření. Ty mohou nastat ve vstupní a sběrné optice, při vícefotonové absorpci nebo srážkovou relaxací<sup>7</sup>. *Laserová analytická fluorescenční spektroskopie* se využívá při chemickém výzkumu a studiích (např. fluorescence buněčných makromolekul, studium průběhu chemických reakcí).

Laserem indukované fluorescence využívá metoda *laserem indukované fluorimetrické detekce (LIF)*. Paprsek laseru prochází kapilárou (průtokovou celou), je zaznamenávána emise fluorescenčního záření jednotlivých fluoreskujících molekul nebo molekul fluorescenčně značených<sup>8</sup>. Tato metoda stanovení byla již použita například ke stanovení albuminu z lidského séra ve vazbě na molekuly-fluorescenční sondy<sup>9</sup>. Metoda byla použita také ke stanovení uranu ve vzorcích z průmyslové krajiny<sup>10</sup>.

## **2.5 Užití molekulové fluorescenční spektroskopie a spektrometrie**

Přímé kvantitativní stanovení dané látky pomocí fluorescence lze použít pouze tehdy, pokud molekula analytu při excitaci poskytuje dostatečný kvantový výtěžek. Pokud analyt není schopen fluorescence nebo je jeho kvantový výtěžek příliš nízký, můžeme použít nepřímou analýzu. Jedním z přístupů je nechat reagovat analyt s činidlem na měřitelný komplex, který je možné fluorimetricky stanovit přímo.

Druhým přístupem je měřit pokles intenzity fluorescenčního záření roztoku dodaného k analytu, přičemž molekuly analytu vyvolávají u dodané fluoreskující molekuly nezářivou deaktivaci nebo s fluoreskující molekulou reagují na fluorescence neschopný produkt<sup>1</sup>.

Až na pár výjimek, jmenovitě např.  $\text{UO}_2^{+}$ , většina anorganických iontů není schopna fluorescence pro jejich přímou analýzu. Mnohé kovové ionty však mohou být stanoveny reakcí s organickým ligandem vedoucí k tvorbě fluorescenceschopného nebo méně často fosforescenceschopného komplexu poskytujícího dostatečný kvantový výtěžek pro účely stanovení. Přehled iontů a chelátových činidel zachycuje *tabulka 1*. Jedním z příkladů je chelátový ligand - sodná sůl 2,4,3'-trihydroxyazobenzen-5'-sulfonová kyselina, také známá jako alizarin garnet R, která vytváří fluoreskující komplex kov-ligand s ionty  $\text{Al}^{3+}$ . K analýze se používá excitační vlnová délka 470 nm, fluorescence je zaznamenávána na vlnové délce 500 nm<sup>1</sup>.

Několik anorganických nekovových sloučenin může být určeno na základě jejich schopnosti omezit, nebo přímo zhaset fluorescenci jiných sloučenin. Příkladem je stanovení  $\text{F}^-$ , které je založeno na jeho schopnosti zhaset fluorescenci komplexu  $\text{Al}^{3+}$ -alizarin garnet R<sup>1</sup>.

Organické sloučeniny obsahující aromatická jádra jsou obecně schopny fluorescence. Aromatické heterocyklické sloučeniny často fosforeskují. Mnoho důležitých biochemických, farmaceutických a environmentálně důležitých molekul patří mezi aromatické sloučeniny a je proto možné stanovovat pomocí fluorimetrie nebo měřením fosforescence. Přehled takových sloučenin zachycuje *tabulka 2*. Pokud organická sloučenina není v přirozeném stavu schopna fluorescence nebo fosforescence, lze ji začlenit do chemické reakce poskytující fluorescenční nebo fosforescenční produkt. Tak lze stanovit enzym kreatinfosfokináza, který katalyzuje tvorbu kreatinu z fosfokreatinu. Kreatin utvářený enzymem necháme reagovat s ninhydrinem, reakce poskytuje fluorescence schopný produkt<sup>1</sup>.

Metody fluorescenční spektroskopie jsou také vhodné ke stanovení aromatických složek petrolejové frakce. K identifikaci jednotlivých složek je vhodné použít excitační záření o vlnové délce 250 nm. Tím je zaručena identifikace většiny aromatických uhlovodíků<sup>11</sup>.

Metoda FIA využívající pH gradient byla užita ke fluorescenčnímu stanovení složek směsi kovových iontů (Zn, Cd, Pb, Al a Mg) tvořících fluoreskující komplex s chelatačním činidlem 8-hydroxychinolin-5-sulfonovou kyselinou (HQS). Při

dostatečně vysokém pH byly ionty kovů vázány též ionty hydroxidovými na úkor formovaného komplexu. Spektrofluorimetrické monitorování reakční zóny v čase poskytovalo pro daný komplex kovového iontu s HQS a směs komplexu s kovem vázaným do hydroxidu charakteristické dva píky<sup>12</sup>.

*Tabulka 1: Vybraná chelatační činidla pro fluorimetrické stanovení anorganických iontů kovů*

Chelatační činidlo	Kovové ionty
8-hydroxychinolin	Al <sup>3+</sup> , Be <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Li <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> (a další)
flavonal	Zr <sup>2+</sup> , Sn <sup>4+</sup>
benzoin	B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup> , Zn <sup>2+</sup>
2',3,4',5,7-pentahydroxyflavon	Be <sup>2+</sup>
2-(o-hydroxyfenyl) benzoxazol	Cd <sup>2+</sup>

*Tabulka 2: Vybrané organické sloučeniny biochemicky, farmaceuticky a environmentálně významné, jejichž molekuly vykazují přirozenou fluorescenci a fosforescenci*

Třída sloučenin	Název sloučeniny
Aromatické aminokyseliny	Fenylalanin (F)
	Tyrosin (F)
	Tryptofan (F,P)
Vitamíny	Vitamin A (F)
	Vitamin B <sub>2</sub> (F)
	Vitamin B <sub>6</sub> (F)
	Vitamin B <sub>12</sub> (F)
	Vitamin E (F)
Katecholaminy	Dopamin (F)
	Norepinefrin (F)
Léčiva a narkotika	Chinin (F)
	Salicylová kyselina (F,P)
	Morfin (F)
	Barbituáty (F)
	LSD (F)
Kontaminanty životního prostředí	Pyren (F)
	Benzopyren (F)
	Organothiofosforečnanové pesticidy (F)
F= fluorescence	P=fosforescence

## 2.6 Zdroje excitačního záření pro fluorescenční spektrometrii

Zdroje užívané k produkci excitačního záření vyzařují čárová nebo spojitá spektra. Pro získání z hlediska měření správné produkce fluorescenčního záření je vhodné, aby se vlnová délka excitačního záření co nejvíce blížila vlnové délce excitačního maxima sledované molekuly, která má konat fluorescenci. Pokud zdroj vyzařuje spojité spektrum, lze vlnovou délku excitačního maxima sledované molekuly získat pomocí monochromátoru. Toho však nelze dosáhnout u čárových spekter. Použití zdrojů produkujících čárová spektra proto s sebou často nese použití fluorescenčního značení sledovaných molekul či iontů (např. pomocí tzv. fluorescenčních sond), které zajistí přítomnost excitačního maxima na příslušné čáře zdrojem vyzařovaného spektra.

### 2.6.1 Laserové zdroje

*Laserové zdroje (Lasers)* jsou užívány jako zdroj záření při molekulové fluorescenční spektrometrii (spektrofluorimetrii).

Lasery vynikají nad ostatními zdroji excitačního záření v několika oblastech. Emitují vysoce koherentní, vysoce monochromatické až monofrekvenční záření. Využívají se například dusíkové, excimerové nebo neodymové lasery. Jejich záření může být zaostřeno na plochu o rozměrech v řádu několika mikrometrů. Laserové zdroje jsou také schopny vytvářet pulzy záření o velmi krátké době trvání, od mikrosekundových pulzů až po nanosekundové pulzy. Krátká doba trvání pulzů s sebou přináší celkově menší množství rozptýleného záření, které by mohlo být zdrojem interferencí rušících podmínky, za kterých nastává fluorescence<sup>13</sup>.

### 2.6.2 Výbojky

*Výbojky* jsou užívány jako zdroj záření při molekulové fluorescenční spektrometrii (fluorimetrii).

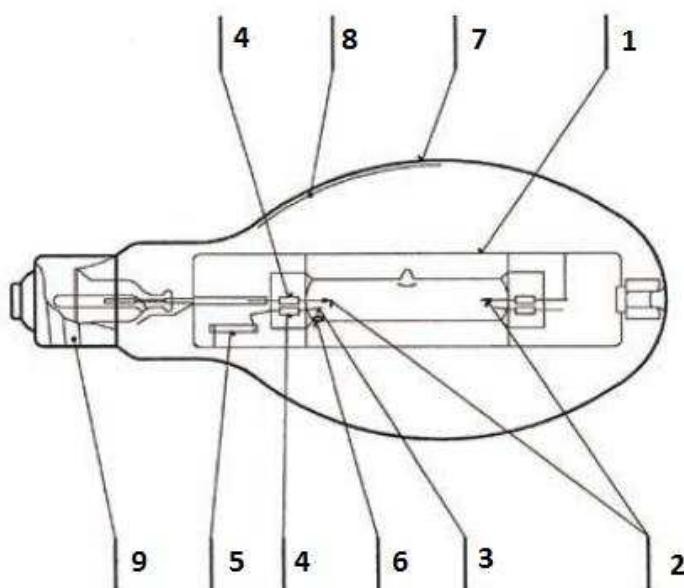
Ve výbojkách dochází k elektrickému výboji v plynech a parách kovů. Jedná se o obloukový výboj, který nastává mezi katodou a anodou uvnitř plynotěsné trubice s obsahem příslušné náplně. Elektrony uvolněné z katody postupují k anodě a vyvolávají lavinovitou ionizaci náplně. Atomy náplně výbojky jsou ionizovány proudem elektronů (tzv. katodové záření) mezi elektrodami a jsou zdrojem světelného záření<sup>14,15</sup>.

Podle úrovně tlaku plynové náplně rozeznáváme tři základní kategorie výbojek. *Nízkotlaké výbojky* využívají k produkci záření např. páry sodíku a rtuti a jejich



výstupní spektrum je čárové v oblasti UV/VIS spektra. *Střednětlaké* výbojky využívají k produkci záření např. páry rtuti a jejich výstupní spektrum je rovněž čárové v oblasti UV/VIS spektra. *Vysokotlaké* výbojky využívají k produkci záření elektrický výboj v xenonu, plynném vodíku nebo deuteriu a emitují spojité spektrum v UV oblasti spektra<sup>14</sup>.

Výbojkami produkované spojité záření je rozkládané na monochromátoru, tímto způsobem je pro účely měření molekulové fluorescence vymezena příslušná excitační vlnová délka.



Obrázek 6: Konstrukční uspořádání rtuťové výbojky. 1-nosný rámeček, 2-hlavní elektrody, 3-pomocná elektroda, 4-molybdenová folie, 5-termistor, 6-rtuť, 7-vnější baňka, 8-luminofor, 9-závitová patice

## 2.7 Detektory fluorescenčního záření - optoelektronická zobrazovací zařízení

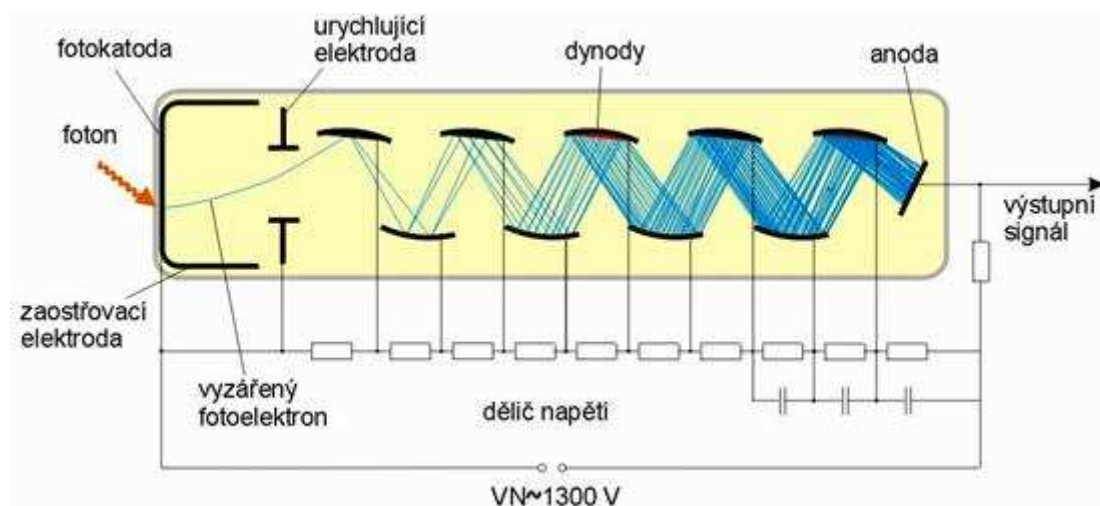
### 2.7.1 Fotonásobiče

Základem fotonásobiče (photomultiplier tube) je fotokatoda, která emituje po dopadu světla (fotonů fluorescenčního záření) na základě vnějšího fotoelektrického jevu elektrony. Jedná se v podstatě o malý čip z polovodičového materiálu (např. na bázi arzenidu galia). Fotonásobič dále sestává ze série dynod ze slitiny mědi a berylia. Jedná se o jakési destičky, na které je přiloženo vysoké napětí. Fotokatoda, dynody a anoda

jsou pod vysokým napětím zapojeny do jednoho obvodu. Vše je instalováno ve vakuově uzavřené trubici s okénkem propouštějícím UV záření.

Dopad fotonu na fotokatodu vyvolá vyrazení elektronu, vyražený elektron má nízkou kinetickou energii. Elektron je napětím akcelarován k první dynodě, odkud po dopadu vyrazí dva a více sekundárních elektronů. Tyto sekundární elektrony jsou napětím akcelarovány k další dynodě, kde po dopadu vyrazí další elektrony, a to samé se opakuje na dalších elektrodách. Výsledkem, přibližně po 20 ns, je pulz  $10^5 - 10^7$  elektronů, které po přibližně 2 ns dopadají na anodu. Urychlené elektrony dopadají na anodu, kde jsou zdrojem elektrický signálu úměrného původnímu množství fotonů fluorescenčního záření.

Kvantová účinnost fotonásobiče typu RCA C31034A PMT se pohybuje v rozsahu od 15 do 35%, snímá záření o spektrálním rozsahu od 220 do 850 nm<sup>13</sup>.



Obrázek 7: Konstrukční schema fotonásobiče

## 2.7.2 SIT snímací elektronika

Základem SIT snímací elektronky (silicon intensified target vidicon) je polovodičový prvek, který sestává z ostrůvků polovodiče typu P na bázi křemíků umístěných na destičce polovodiče typu N na bázi křemíku. Přechod P-N v místě rozhraní destičky a ostrůvků vytváří efekt polovodičové diody. Při chodu detektoru jsou jednotlivé ostrůvky součástí obvodu, celý prvek má charakter anody, a na jednotlivé ostrůvky dopadá směřovaný elektronový paprsek. Ostrůvky vytvářejí pole 1000 x 1000 jednotek na ploše o průměru 16 mm (typ RCA 4804 SIT).

Když fotony fluorescenčního záření dopadají na fotokatodu, vyvolají v rámci vnějšího fotoelektrického jevu emisi fotoelektronů. Ty jsou akcelerovány napětím směrem k anodě, kde vyvolávají na jednotlivých přechodech tvorbu párů elektron-díra. Tvorba těchto přechodů je zdrojem elektrického signálu, který je vyhodnocován dalšími prvky detektoru.

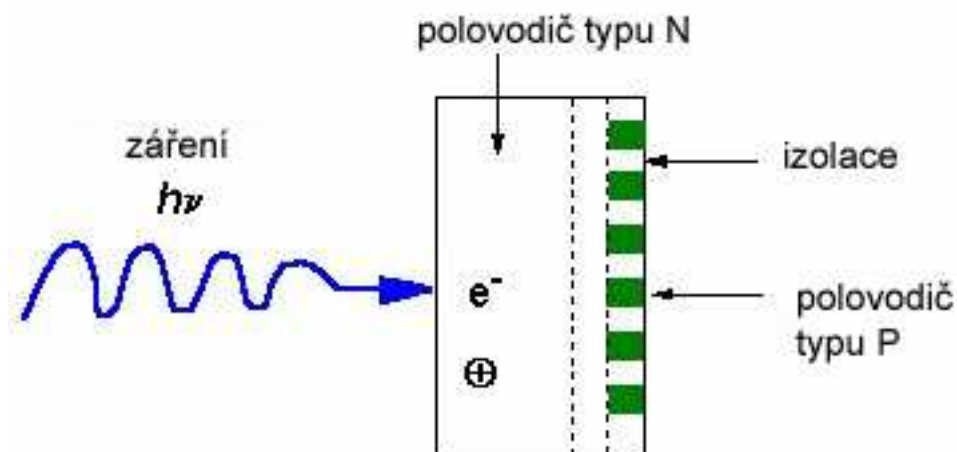
Detektor umí pracovat ještě v druhém módu, tzv. integračním módu (integration mode). Fotokatoda je v přesně daném čase vystavena zdroji záření. Ve výše vedeném polovodičovém prvku dojde k vytvoření páru elektron-díra, který při vhodné zvolené teplotě udržované chladícím zařízením vydrží relativně dlouho. Následně je z druhé strany výše uvedený polovodičový prvek ozařován elektrony generovanými elektronovým dělem (generace termoemisí); urychlené elektrony jsou prostřednictvím zaostřovacích elektrod směřovány na jednotlivé P-N přechody. Před jejich dopadem ještě dojde k jejich zpomalení. Dochází k zániku původního rozložení elektronů a k tvorbě detegovatelného elektrického signálu<sup>13</sup>.

### 2.7.3 Detektory s diodovým polem

Základem detektoru s diodovým polem (self-scanned diode array) je čip složený z řady fotodiod. Fotodiody jsou široké 25  $\mu\text{m}$  a vysoké 2,5 mm (typ RL1024S). Sestávají z ostrůvků polovodičového materiálu typu P a z destičky z polovodičového materiálu typu N. Přechod P-N v místě rozhraní destičky a ostrůvků vytváří efekt polovodičové diody. Dopadající fotony fluorescenčního záření vytvářejí na osvětlené straně diody na základě vnitřního fotoelektrického jevu v polovodičovém materiálu typu N pár elektron-díra, elektrony migrují na nejbližší P-N přechod, výsledkem je tvorba elektrického napětí na obou stranách diody. Řada diod je součástí měřicího obvodu, změna napětí je registrována jako signál úměrný množství fotonů fluorescenčního záření.

Vysoké kvantové účinnosti detektoru (quantum efficiencies, účinnost detektoru měnit světelnou energii dopadajícího záření na energii elektrickou, která je vyhodnocována jako zdroj signálu) je dosahováno v oblasti viditelného a blízkého infračerveného záření. V oblasti ultrafialového záření je kvantová účinnost detektoru menší než u fotonásobičového detektoru.

Stejně jako SIT vidicony mohou detektory s diodovým polem pracovat v tzv. integračním módu<sup>13</sup>.



Obrázek 8: Konstrukční schéma detektoru s diodovým polem

## 2.8 Tenzidy – povrchově aktivní látky

### 2.8.1 Vymezení pojmu tenzid

*Tenzid* je organická látka, která je schopna se hromadit již při nízké koncentraci na fázovém rozhraní a tím snižovat mezifázovou energii soustavy<sup>16</sup>.

*Mezifázová energie* ( $\gamma$ ) je práce potřebná k vratnému a izotermnímu vzniku jednotkové plochy fázového rozhraní, spojeného s převodem molekul z nitra objemové fáze do fázového rozhraní<sup>17</sup>. Charakterizuje rozhraní kapalina/tuhá látka nebo kapalina/kapalina. Jednotkou je  $\text{J.m}^{-2}$ .

*Povrchová energie kapaliny* je práce potřebná k vytvoření jednotkové plochy nového povrchu kapaliny na daném fázovém rozhraní v systémech kapalina/plyn<sup>17</sup>. Číselně i rozměrově je rovna povrchovému napětí soustavy. Jednotkou je  $\text{J.m}^{-2}$ .

*Povrchové napětí kapalin* ( $\sigma$ ) charakterizuje konkrétní fázové rozhraní soustavy kapalina/plyn. Je definováno jako síla (tzv. povrchová síla), která působí ve směru tečny k povrchu daného rozhraní na úsečku jednotkové délky. Jednotkou je  $\text{N.m}^{-1}$ , údaj je doplněn o druh konkrétního rozhraní<sup>18</sup>. Například povrchové napětí vody na rozhraní voda/vzduch činí  $74,3 \cdot 10^{-3} \text{ N.m}^{-1}$ .

*Povrchově aktivní látka* je látka, která se samovolně hromadí na fázovém rozhraní, kde snižuje povrchovou, případně mezifázovou energii<sup>17</sup>. Díky tomu je na rozhraní tzv. pozitivně absorbována.

### 2.8.2. Mechanismus čistících účinků tenzidů

S tenzidy přicházíme v rámci svých hygienických návyků do styku prakticky denně. Jejich molekuly vykazují polární a nepolární část. V polárním prostředí vodného roztoku molekuly tenzidu disociují. Tím se uvolní samotná účinná složka tenzidu, kterou bývá nejběžněji anion s navázaným lineárním nepolárním řetězcem. Účinnou složkou je tedy v případě obyčejných mýdel k mytí rukou na bázi dodecylsírany sodného ( $C_{12}H_{25}SO_4Na$ ) dodecylsíranový anion ( $C_{12}H_{25}-SO_4^-$ ).

Účinná složka vykazuje *detergenci*, tedy schopnost převádět nečistotu z tuhé fáze (ušpiněný pevný povrch) do objemové fáze roztoku<sup>16</sup>. Nečistotou je nejčastěji směs různých tuků, ve které jsou zachyceny nejrůznější pevné nečistoty, např. šupinky kůže, oleja zbytky potravy<sup>19</sup>. Vykazuje navenek nepolární charakter a nelze ji proto odstranit samotnou vodou. Účinná složka tenzidu se hromadí na fázovém rozhraní voda/tuhá látka (směs tuků). Nepolární část účinné složky tenzidu adsorbuje k nečistotě, zatímco její polární část je vtahována do vodného prostředí. Tato síla nakonec překoná povrchovou sílu, kterou je vnější vrstva molekul nečistoty přitahována jejími vnitřními vrstvami molekul, a ionty účinné složky tenzidu s navázanou nečistotou jsou vtaženy do vodného prostředí. Nečistota je tedy z ušpiněného povrchu přenesena na místo, kde její přítomnost tolik nevádí (odpadní voda). *Detergent* je směs tenzidů a dalších látek, které zvyšují detergenční vlastnosti této směsi. V praxi jsou k dispozici práškové prací prostředky a kapalné mycí a prací prostředky.

### 2.8.3 Klasifikace tenzidů

*Mýdla* jsou soli vyšších mastných kyselin, kationty v jejich struktuře jsou nejčastěji alkalické kovy.

*Saponáty* je starší nepřesný název pro syntetické tenzidy.

*Saponiny* jsou glykosidické tenzidy obsažené v rostlinách.

*Syndet* je zkratka názvu syntetický detergent, který jako tenzid neobsahuje mýdlo, ale syntetický tenzid.

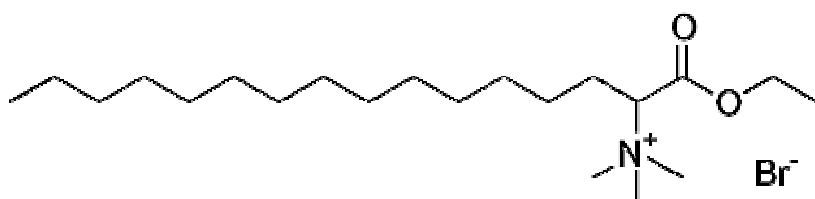
Podle ionogenity molekul a jejich následovného chování vůči rozpouštědlu rozlišujeme následující kategorie tenzidů:

*Tenzidy ionogenní*, u kterých rozlišujeme kategorie *anionaktivní* a *kationaktivní tenzidy*. Jejich molekuly mají výrazně oddělenou polární a nepolární část, a ve vodě disociují na ionty.

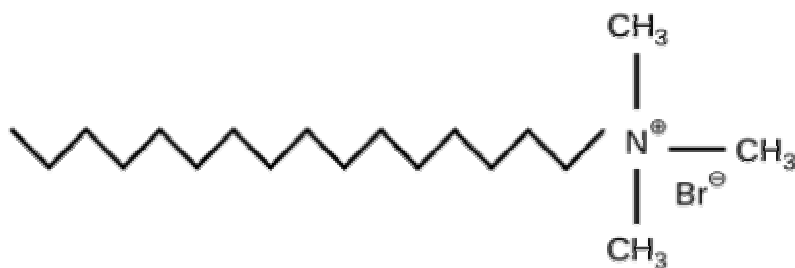
Anionaktivní tenszidy mají jako svou účinnou složku, nesoucí nepolární část řetězce, objemný aniont. *Mýdla* jsou sodné, draselné a někdy i amonné sole vyšších mastných nasycených i nenasycených kyselin. Příkladem *syntetických anionaktivních tenzidů* je dodecylsulfát sodný a sek-dodecylsulfonan sodný. Bývají součástí kapalných a práškových mycích a pracích prostředků.

Kationaktivní tenszidy mají jako svou organickou kationtovou účinnou složku, nesoucí nepolární část řetězce, téměř ve všech případech kvartérní amoniovou bázi. Ta vytváří s anorganickým, například chloridovým aniontem kvartérní amoniovou sůl. Vykazují antiseptické a dezinfekční účinky, ničí mikrobiální organismy. Proti anionaktivním tenzidům vykazují značnou variabilitu uspořádání molekul. Nejvýznamnější sloučeninami jsou kvartérní amoniové soli alifatických, alifaticko-aromatických aminů a sole pyridinu<sup>19</sup>. Příkladem kationaktivního tenzidu je *septonex*, kvartérní amoniová sůl trimethylamoniumbromid ethylesteru kyseliny palmitové (*obrázek 9*), nebo CTAB, cetyltrimethylamonium bromid (*obrázek 10*). V této diplomové práci byly oba zmiňované tenszidy využívány pro vývoj metody stanovení kationaktivních tenzidů.

*Tenzidy neionogenní (neionické)*, u kterých rozlišujeme kategorie *oxyethylenáty*, pro které se v literatuře používá technický název *ethoxyláty*, a *polyhydroxysloučeniny*<sup>16</sup>. Oxyethylenáty obsahují proti původní molekule více oxyethylenových skupin (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-). Ve vodě na ionty nedisociují, jejich molekuly vykazují polární oblast nesoucí částečný kladný a částečně záporný náboj. Ten může být dán například lokální vyšší koncentrací kyslíkových atomů v molekule. Jsou součástí mycích a pracích prostředků.



Obrázek 9: Strukturní vzorec molekuly *septonexu*



Obrázek 10: Strukturní vzorec molekuly CTAB

## 2.8.4 Tenzidy a spektrofluorimetrie

Tenzidy mohou v roztoku ovlivňovat mikroprostředí fluoreskujících látek a měnit tak jejich charakteristické fluorescenční parametry - excitační a emisní spektrum nebo kvantový výtěžek fluorescence, mohou se projevovat při zhašecích procesech a podobně. Těchto vlivů tenzidů na různé fluoreskující látky se využívá hojně při chemickém výzkumu a studiích (např. rychlosti tvorby a struktury vznikajících produktů, objasnění hydrofóbních interakcí micel)<sup>20</sup>.

Tenzidy mají vliv na excitační a fluorescenční spektra látek používaných pro fluorescenční analýzu iontů kovů. Může docházet až ke stonásobnému zvýšení intenzity fluorescence fluoreskujícího produktu. Zvýšení kvantového výtěžku je mimo jiné přisuzováno micelární solubilizaci fluoreskujícího produktu i vlivu polaritě prostředí, která je v přítomnosti tenzidů změněna. V analytické praxi bylo využito tenzidů např. při fluorimetrickém stanovení kationtů hliníku, galia, india či niobu lumogallionem nebo morinem<sup>20</sup>.

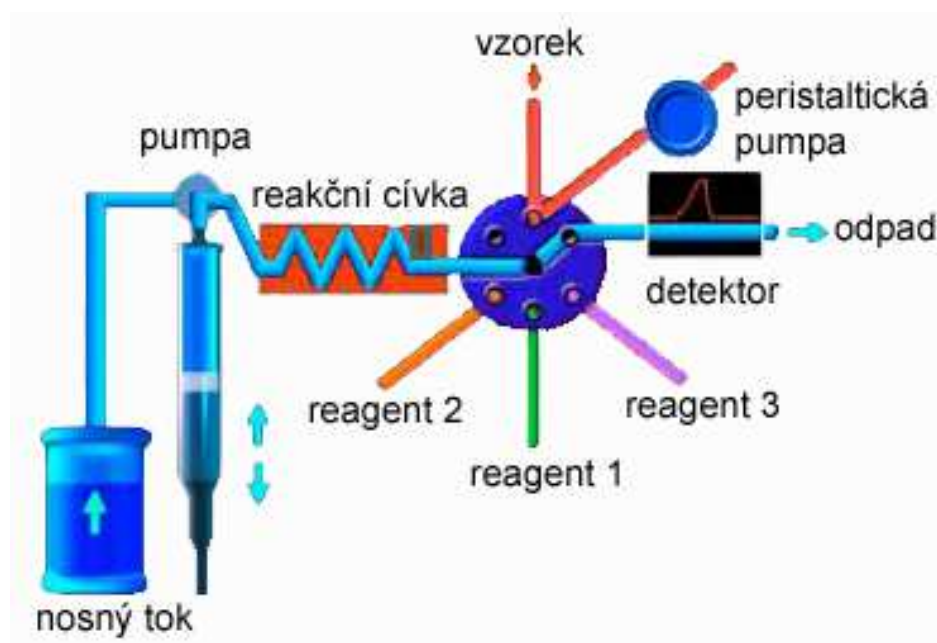
## 2.9 Analytické metody užitečné ke stanovení tenzidů

### 2.9.1 Sekvenční injekční analýza

*Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA)* patří do skupiny průtokových analytických technik. SIA je dalším vývojovým stupněm průtokové injekční analýzy (Flow Injection Analysis). První článek definující koncepci SIA, byl zveřejněn v roce 1990. U zrodu metody stála skupina analytiků z University of Washington.

Při stanovení analytu metodou SIA je naší snahou vytvořit v mísící cívce přístroje asociát analytu s vhodným činidlem a následně ho po ukončení jeho tvorby detekovat vhodnou spektrometrickou nebo elektrochemickou metodou stanovení. Hovoříme o tzv. oddělených měřících cyklech. Základní části aparatury pro SIA zachycuje následující

obrázek (obrázek 11). Systém je tvořen jednokanálovým dvojsměrným pístovým čerpadlem, vícecestným selekčním ventilem, vhodným detektorem, mísící cívkou, která slouží zároveň jako pojistka proti vniknutí vzorku a činidel do čerpadla, a spojovacím materiálem. Systém SIA pracuje v naprogramovaném cyklu pohybů pístu čerpadla, synchronizovaném s přepínáním pozic selekčního ventilu<sup>21</sup>. Součástí systému je proto řídicí počítač, může být použito běžné PC.



Obrázek 11: Konstrukční schéma aparatury SIA

Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla prostřednictvím pístového čerpadla dodány vícecestným ventilem do jednokanálového systému<sup>21</sup>. Poté je pohyb čerpadla obrácen, dojde k promísení vzorku s činidlem a vzniklý produkt je dopraven do detektoru a tím je cyklus ukončen (je využívána změna přímého a zpětného toku). Změnou toku je dosaženo vyššího stupně konverze analytu na detekovatelný produkt. Vzniklý záznam, který je funkcí okamžité koncentrace detekovatelného asociátu a detektorem měřené veličiny, má formu píku jako v případě průtokové injekční analýzy. Jedná se o křivku grafu závislosti odezvy detektoru na čase (měřicího cyklu). Používají se nejčastěji spektrometrické, fluorescenční a elektrochemické detektory s průtokovými měřícími celami<sup>21</sup>. Průtokové rychlosti SIA se prakticky neliší od FIA a dosahují  $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , doba trvání jednoho měřicího cyklu u SIA nepřesahuje 30 sekund.

Metoda SIA byla již dříve užita ke stanovení tenzidů v přírodní vodě. Například pomocí monoklonálních protilátek vázaných na magnetické mikrokuličky (microbeads)



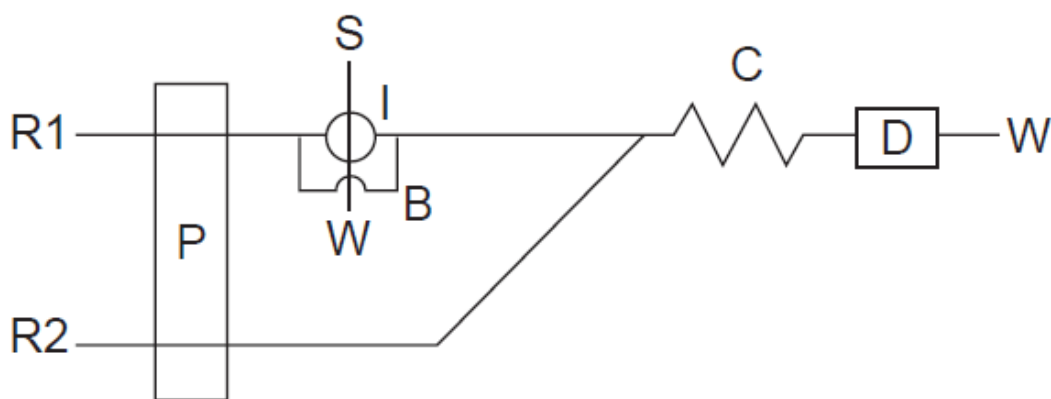
byly vytvořeny komplexy anionionaktivních tenzidů ze skupin lineárních alkylbenzenových sulfonátů. Výsledný reakční produkt byl stanoven detekcí emitovaného chemiluminiscenčního záření<sup>22</sup>.

Za využití SIA byly také stanoveny asociáty monoklonálních protilátek vázaných na magnetické mikrokuličky (microbeads) a neionických tenzidů ze skupiny alkylfenol ethoxylátů v přírodní vodě. Principem detekce byl záznam emitovaného chemiluminiscenčního záření výsledného reakčního produktu<sup>23</sup>.

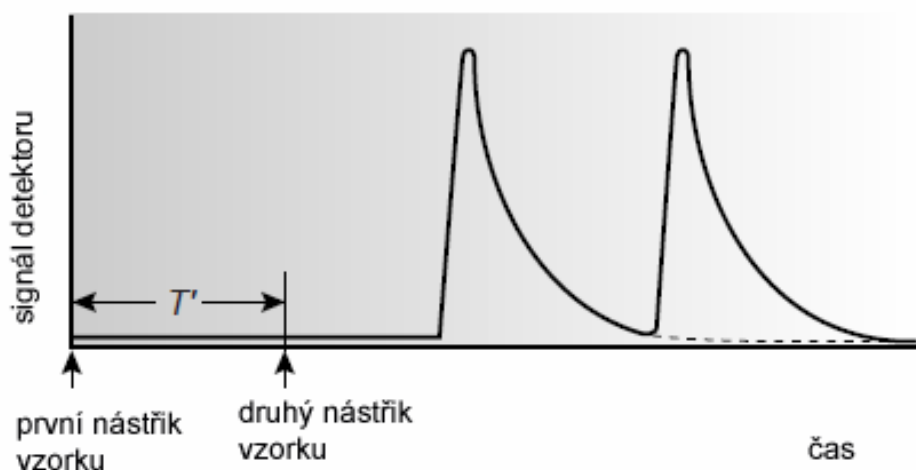
### 2.9.2 Průtoková injekční analýza

*Průtoková injekční analýza (Flow injection analyses, FIA)* patří do skupiny analytických metod zvané průtokové analytické techniky, které využívají postupného dávkování vzorků v pravidelných intervalech do proudu nosného média, dopravujícího vzorky k detektoru. Metoda byla vyvinuta v polovině 70. let 20. století jako vysoce produktivní technika pro sériovou analýzu vzorků<sup>1</sup>.

Základní funkční komponenty aparatury pro FIA jsou zachyceny na *obrázku 12*. Reagenční činidlo sloužící zároveň jako nosné médium je uskladněno v zásobníku. Čerpadlo udržuje konstantní průtok nosného média skrz vedení. Vzorek je dávkovacím ventilem vstříknut přímo do proudu nosného média. Směs prochází reakční cívkou. V reakční cívce probíhá chemická reakce – např. vzniká asociát činidla a analytu. Po opuštění reakční cívky je produkt chemické reakce detekován v průtokové měřící cele příslušného detektoru. Detektor podle okamžité koncentrace reakčního produktu ukazuje závislost měřené veličiny na čase, v podobě tzv. fiagramu (*obrázek 13*). Využívají se rovněž složitější uspořádání aparatur, kde existuje několik oddělených zásobníků pro činidla a nosné médium, přičemž výsledná směs pro reakci s analytem se utváří cestou do reakční cívky<sup>1</sup>.

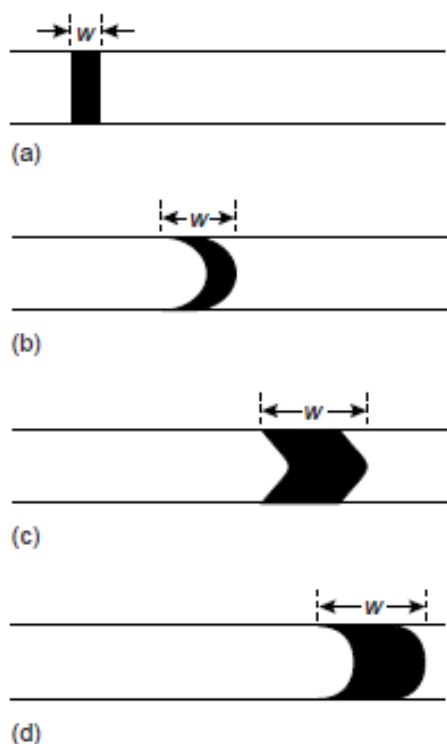


Obrázek 12: Konstrukční schéma aparatury FIA. R1, R2- zásobníky reagenčních činidel, P- peristaltická pumpa, S- vzorek, I - dávkovací ventil, B- dávkovací smyčka, W- odpad, C- reakční cívka, D- detektor.



Obrázek 13: FIA gram

Disperze (rozptýlení) vzorku s analytem do nosného proudu s činidlem zprostředkovává mechanismus konvekce v důsledku toku nosného média a difúze v důsledku existence koncentračního gradientu mezi vzorkem a nosným proudem. Disperze analytu do proudu nosného média s činidlem je prvních 100 ms po nástřiku vzorku zajištěno konvekcí (prouděním). K difúzi dochází v axiálním i radiálním směru ve vztahu ke směru nosného proudu. Difúze zároveň pomáhá kromě mísení udržovat integritu v celém objemu proudu výsledné směsi. Difúze a konvekce působí součinně přibližně 3-20 sekund po nástřiku vzorku, po 25 sekundách se v disperzi znatelně uplatňuje pouze difúze, proud výsledné směsi získává konečný parabolický čelní profil (obrázek 14)<sup>1</sup>.



Obrázek 14: Profil toku v závislosti na čase při FIA analýze a) při nástřiku vzorku, b) po disperzi vzorku v důsledku konvekce, c) po působení konvekce a difúze, po působení difúze (d).

Jako čerpadlo pro udržování konstantního nosného proudu se používá nejčastěji peristaltická pumpa. Peristaltická pumpa sestává ze sady válečků připojených zevnějšku na otočný válec. Trubice vedení činidla s nosným médiem se nachází mezi válcem s válečky a pevnou nehybnou přítlačnou částí. Jak se otáčí válec s válečky, válečky mačkají trubici vedení, a posouvají tak kapalný obsah vedení ve směru rotace válce. Peristaltická pumpa poskytuje konstantní rychlost proudění kapalného obsahu vedení, danou rychlostí otáčení bubnu a vnitřním průměrem trubice. Zpravidla poskytuje průtok v rozsahu  $0,0005$  až  $40 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , přičemž rozsah hodnot průtoku užívaný při FIA dosahuje  $0,5 - 2,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Nevýhodou peristaltických pump je, že vytváří pulzující tok kapaliny, který může vést k oscilacím signálu detektoru.

Nástřik vzorku probíhá nejčastěji pomocí šesticestného dávkovacího ventilu s vyměnitelnou smyčkou. Nástřik se provádí v objemu obvykle  $5 - 200 \mu\text{l}$ .

FIA využívá mnohé z detektorů užívaných při HPLC. Jedná se zejména o spektroskopické detektory, využívající UV/VIS absorpce analytu a jeho fluorescenční vlastnosti. Pomocí průtokové cely UV/VIS detektory zaznamenávají absorbanci jako

funkci času; každému časovému momentu odpovídá příslušná okamžitá koncentrace analytu. Jsou využívány rovněž elektrochemické detektory na bázi ampérometrie, voltametrie, coulometrie a konduktometrie. Často jsou užívány iontově selektivní elektrody.

### 2.9.3 Rovnovážná potenciometrie

*Rovnovážná potenciometrie* patří do skupiny elektrochemickým analytických metod. Analyt je stanoven z rovnovážného napětí elektrochemického článku tvořeného indikační elektrodou ponořenou do analyzovaného roztoku a referentní elektrodou spojenou s analyzovaným roztokem solným můstkem. Napětí je měřeno za podmínek, při nichž článkem neteče elektrický proud<sup>24</sup>.

Ke stanovení koncentrace kationaktivního tenzidu septonexu byla použita jako indikační elektroda iontově selektivní elektroda typu SPE (Screen-Printed Electrode). Elektroaktivní složka elektrody byla založena na tvorbě komplexu septonex-tetrafenylboran (tetraphenylborate). Jako plasticizující složka elektrody sloužil o-nitrofenyloktyleter (o-NPOE). Vzniklý senzor byl vysoce selektivní na septonex napříč širokým spektrem sloučenin, jako významné interferenty byly identifikovány iodidové ionty a cetyltrimethylamonium bromid. Dolní mez detekce senzoru činila  $9 \cdot 10^{-7}$  M. Iontově selektivní elektroda senzoru byla otestována na laboratorně připravených vzorcích při přímé potenciometrii, její modifikovaná verze také při potenciometrické titraci. Užitečnost senzoru byla doložena jeho schopností stanovit septonex v laboratorně připravených farmaceutických vzorcích<sup>25</sup>.

## 2.10 Analytické metody užité k separaci tenzidů

### 2.10.1 Vysoceúčinná kapalinová chromatografie

*Vysoceúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)* je užívána jako separační metoda určená k oddělení molekul tenzidů ze směsi. HPLC se vyvinula z plynové chromatografie v počátcích 70 - tých let 20. století. Vysokých účinností separace se dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Tím se dosahuje účinnosti řádově desítek tisíc pater na jednotku kolony<sup>26</sup>. Dávkuje se malá množství analytu, pro dosažení dostatečného průtoku je potřeba aplikovat tlak v řádu jednotek až desítek MPa.

Separční kolony jsou většinou vyrobeny z ocelové nebo tlustostěnné trubice o vnitřním průměru 2-5 mm. Jsou naplněny stacionární fází o vhodné zrnitosti, obvykle na bázi oxidu křemičitého, s vhodnými navázanými funkčními skupinami. Jedná se běžně o nepolární uhlovodíkové řetězce<sup>27</sup>.

Pomocí metody HPLC byla například provedena separace neionických tenzidů ze skupiny derivátů nonylfenolu a nonylfenol ethoxylátů<sup>28,29</sup> v odpadní vodě umělého mokřadu<sup>29</sup> a v laboratorních podmínkách simulujících odpadní vodu v umělém mokřadu<sup>28</sup>.

## 2.10.2 Extrakce L-L

K separaci tenzidů ze vzorků odpadní vody lze použít extrakci L-L, tedy extrakci kapalinou. Z polárního prostředí vodného roztoku je analyt převáděn do nepolárního prostředí organického rozpouštědla, z jehož fáze je posléze vhodnou metodou stanovena jeho koncentrace. Účinnost procesu separace mezi rozpouštědly je charakterizována distribučním koeficientem. Bývá využíván postup, kdy stanovovaný analyt nejprve vytváří s vhodným činidlem dokonaleji extrahovatelný komplex, který je po provedení extrakce vhodnou detekční metodou z fáze organického rozpouštědla kvantitativně stanovován.

V praxi bylo například provedeno stanovení anionaktivních tenzidů ze vzorku za využití extrakce vytřepáváním v dělicích nálevkách. Molekuly tenzidů v prostředí polární fáze odpadní vody utvářely s methylenovou modří měřitelný komplex, který byl extrahován vytřepáváním v dělicí nálevce do chloroformové nepolární fáze. Koncentrace komplexu byla po dokončení extrakce stanovena molekulovou absorpční spektrometrií<sup>30</sup>.

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Použité chemikálie

- Na přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda. Pro přípravu deionizované vody byla použita aparatura Milli QPLUS firmy Millipore (USA).
- Methanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $M_r=32,04$ ), čistoty min. 99,8% (Merck, Německo).
- Hydrogenfosforečnan sodný,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $M_r=268,07$ ), k přípravě 25mM fosfátového pufru, čistota min 98% (Sigma Aldrich, USA).
- Sodná sůl 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetrajodofluoresceinu (Bengálská červeň) ( $M_r=904,79$ ), čistota p.a. (Lachema, Československo).
- N-( $\alpha$ -karbethoxypentadecyl)trimethyl ammonium bromid (Septonex),  $\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{BrNO}_2$  ( $M_r=422,89$ ), čistoty dle lékopisu (Slovakofarma, Československo).
- Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB),  $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBr}$  ( $M_r=364,46$ ), čistota p. a. (Lachema, Československo).
- Hydroxid sodný,  $\text{NaOH}$  ( $M_r=39,99$ ), čistota min. 98%, pro analýzu (Chemapol, Československo).
- Kyselina chlorovodíková,  $\text{HCl}$  ( $M_r=36,46$ ), 37% roztok, pro analýzu (Merck, Německo).

Zásobní roztoky byly uchovávány v temnu a chladu v ledničce.

#### 3.2 Použité přístroje a zařízení

- Excitační a emisní fluorescenční spektra příslušných roztoků byla proměřována na luminiscenčním spektrometru AMINCO BOWMAN Series 2 (Aminco, USA); použita byla kyveta z křemenného skla o tloušťce vrstvy 1cm.
- Pro měření pH příslušných roztoků byl použit pH metr Adwa AD1000 firmy Adwa Research (Maďarsko).
- Pro odvažování pevných látek pro přípravu roztoků byly použity elektronické laboratorní váhy Sartorius Research RC 210D (Německo).
- Křemenná průtoková cela pro fluorescenci (typ 583.4F/Q/10/Z15 (440  $\mu\text{l}$ )) firmy Starna (UK).

- Programovatelná peristaltická pumpa Masterflex, výrobce Cole - Parmer (USA), s čerpací osmikanálovou hlavou firmy Ismatec (Švýcarsko).
- Programovatelná peristaltická pumpa model C.P. 78017-20 firmy Ismatec (Švýcarsko).
- Nízkotlaký šesticestný dávkovací ventil typ 5125 firmy Rheodyne (USA).
- Výměnné dávkovací smyčky o objemech 100, 250, 500 a 1000  $\mu$ l byly zhotoveny z teflonových trubiček o vnitřním průměru 0,5 mm.
- Reakční cívky o délkách 20, 40, 60, 80 a 100 cm byly zhotoveny z teflonové trubičky o vnitřním průměru 0,5 mm.
- Pro čerpání všech roztoků byly použity tygonové hadičky různých průměrů.
- Ostatní spojovací hadičky byly zhotoveny z teflonu o vnitřním průměru 0,5 mm.

### ***3.3. Statické experimentální uspořádání pro vývoj metody stanovení kationaktivních tenzidů***

Statické experimentální uspořádání využívalo měřících schopností luminiscenčního spektrometru AMINCO BOWMAN Series 2, ovládaného přes osobní počítač.

Pracovní roztoky barviv, vhodných pro vývoj metody stanovení tenzidů, určených pro změření na luminiscenčním spektrometru, byly připravovány do 50 ml nebo 25 ml odměrných baňek. Z nich byla část roztoků přelévána do křemenné kyvety o tloušťce vrstvy 1 cm ke změření excitačních spekter a emisních spekter při nalezené optimální vlnové délce. Pracovní roztoky barviv s tenzidy, s různými modifikacemi rozpouštědel, byly rovněž připravovány do 50ml nebo 25ml odměrných baněk a proměřovány na zmiňovaném spektrometru s cílem zjistit, jak dané tenzidy při své zvyšující se koncentraci ovlivňují intenzitu fluorescence barviva (zda zvyšují kvantový výtěžek fluorescence nebo působí naopak jako zhášedla). Sledováním výšek fluorescenčních píků jejich emisních spekter bylo zjištěno, že nejvhodnějším barvivem z uvažovaných aniontových barviv pro stanovení Septonexu je Bengálská červeň, v jejímž roztoku kationaktivní tenzid Septonex zhásí fluorescenci zmiňovaného barviva (tvoří iontový asociát, který potlačí fluorescenci samotného barviva). Na stejném luminiscenčním spektrometru byly zjištěny též základní charakteristiky statické metody stanovení. Podrobněji se výsledky a provedením pokusů zabývá oddíl „Výsledková část a diskuze“.

### ***3.4 Průtokové experimentální uspořádání pro stanovení kationaktivních tenzidů průtokovou injekční analýzou***

Pro průtokové stanovení kationaktivního tenzidu Septonexu a pro zjištění základních charakteristik tohoto stanovení byla sestavena aparatura pro průtokovou injekční analýzu (FIA). Principem stanovení Septonexu nebo CTAB bylo sledování intenzity fluorescenčního záření roztoku barviva Bengálská červeň. Intenzita vydávaného záření klesala v přítomnosti zvyšující se množství jmenovaného tenzidu v měřeném roztoku, principem pro určení koncentrace Septonexu byl tedy jev zhášení fluorescence. Podrobněji se výsledky a provedením pokusů zabývá oddíl „Výsledková část a diskuze“.

Aparatura FIA sestává z peristaltické pumpy Masterflex, nízkotlakého šesticestného dávkovacího ventilu s připojenými výměnnými dávkovacími smyčkami, reakční cívky a z křemenné průtokové cely pro fluorescenci. Pro měření fluorescence byl použit luminiscenční spektrometr AMINCO BOWMAN Series2. V aparatuře pro FIA bylo použito dvoukanálové uspořádání. Pro čerpání nosného roztoku složeného z barviva Bengálská červeň a fosfátového pufru v jednom kanálu a pro čerpání deionizované vody v druhém kanálu sloužily hadičky z Tygonu, ostatní hadičky spojující jednotlivé komponenty aparatury byly teflonové. Luminiscenční spektrometr byl řízen připojeným osobním počítačem. Průtok pumpy byl nastavován ručně pomocí jejích ovládacích prvků. Dávkování tenzidu do výměnných dávkovacích smyček bylo realizováno injekční stříkačkou o objemu 10ml.

Průtok v obou kanálech zajišťovala peristaltická pumpa Masterflex. Pro sérii následujících měření byla pro zajištění toku v každém kanálu použita samostatná peristaltická pumpa. Pro zajištění toku v kanálu s deionizovanou vodou byla použita peristaltická pumpa Masterflex, pro zajištění toku v kanálu s barvivem Bengálská červeň a fosfátovým pufrům byla použita peristaltická pumpa C.P. 78017-20.

### ***3.5 Použitý software***

K ovládání luminiscenčního spektrometru AMINCO BOWMAN Series 2 přes osobní počítač byl použit program AB2 Luminiscence spectrometer version 5.50 firmy Thermo Electron. Program umožňoval jak statické proměřování roztoků na spektrometru, tak proměřování roztoků v průtokové měřicí cele ve spojení s aparaturou FIA.



Výsledky měření uložené ve formátu .txt byly zpracovány programem Microsoft Excel 2003. Program byl použit k tvorbě grafů spekter v magisterské práci a k jednotlivým výpočtům, např. základních charakteristik metody.

Kalibrační grafy s chybovými úsečkami byly zpracovány v programu Origin 6.0.

## 4. Výsledková část a diskuze

Pro stanovení kationaktivních tenzidů byla použita reakce mezi tenzidem a anionogenním barvivem, které má fluorescenční aktivitu – Bengálskou červeň. Barvivo Bengálská červeň bylo vybráno na základě předběžných pokusů. Toto barvivo vytváří v alkalickém prostředí s kationaktivními tenzidy ve vodě rozpustné iontové asociáty, které potlačují fluorescenční aktivitu samotného barviva. Stanovení je tedy založeno na měření poklesu fluorescenční aktivity barviva, který je úměrný koncentraci kationaktivního tenzidu.

### 4.1 Dávkové stanovení kationaktivních tenzidů reakcí s barvivem Bengálská červeň

#### 4.1.1. Příprava zásobního roztoku barviva Bengálská červeň

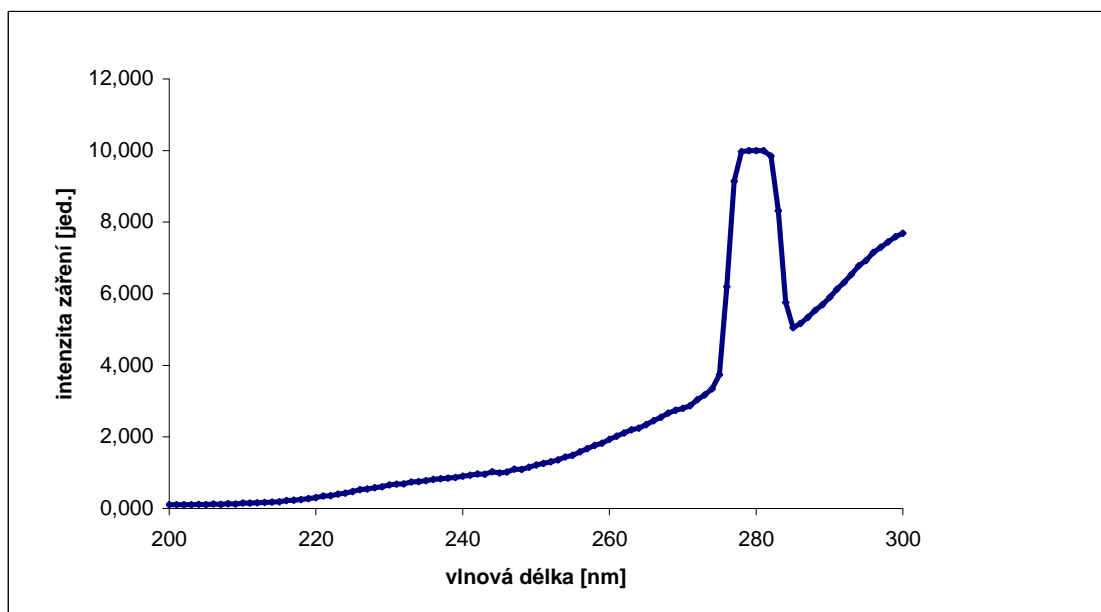
Zvolené barvivo Bengálská červeň obsahuje jako svou barevnou složku objemný organický aniont, který obsahuje mnoho atomů silně elektronegativních prvků. Za laboratorní teploty má charakter červeného prášku. Její sodná sůl je rozpustná dle literatury ve vodě a ethanolu. V textu je barvivo označováno zkratkou RB.

Pro všechny experimenty byl připraven zásobní roztok barviva v methanolu o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  M. Protože nedošlo ke kompletnímu rozpuštění navážené substance, byl zásobní roztok přefiltrován a následně byl zásobní nasycený roztok uchováván v temnu a v chladu. Při předběžných pokusech byla při reakci se Septonexem pozorována změna zabarvení původního roztoku barviva, došlo ke vzniku asociátu.

Pro proměření fluorescenčních spekter byl připraven roztok barviva o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l (zásobní roztok barviva byl ředěn již vodou). U roztoku barviva byla pozorována silná fluorescence při vlnové délce 560 nm.

#### 4.1.2 Excitační spektrum barviva Bengálská červeň

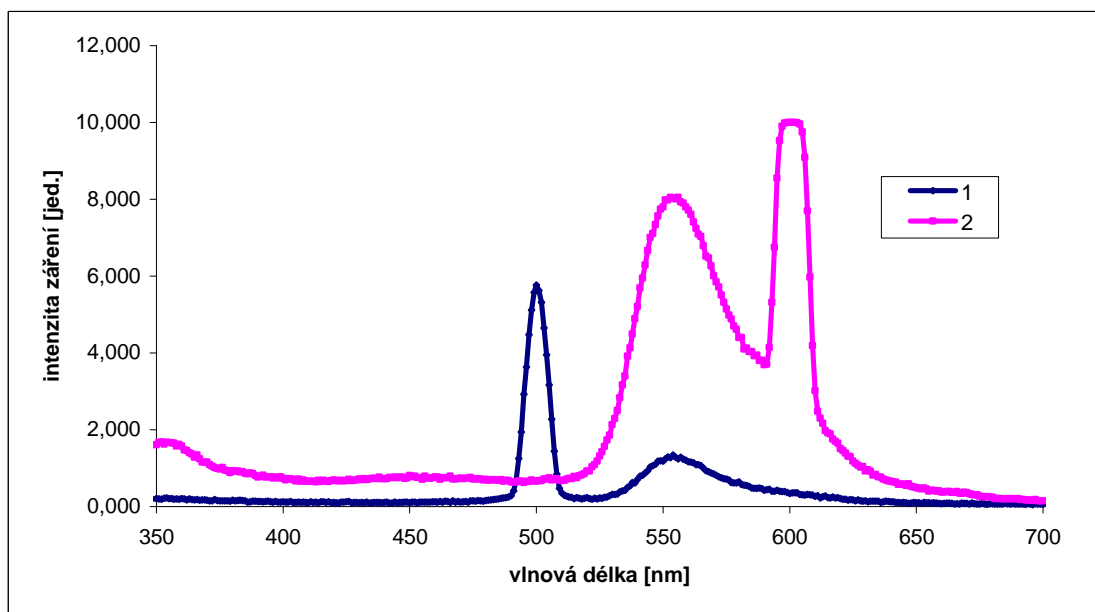
Pro nalezení optimální excitační vlnové délky bylo proměřeno excitační spektrum roztoku RB o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l v rozsahu 200 až 300 nm v emisním maximu RB 560 nm. Jako vhodná excitační vlnová délka byla vybrána hodnota 300 nm. Pík při 280 nm náleží polovině emisní vlnové délky.



Obrázek 15: Excitační spektrum samotného barviva RB o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l.  $U_F = 900$  V;  $v_S = 5$  nm/s;  $\lambda_{em} = 560$  nm.

#### 4.1.3 Emisní spektrum barviva Bengálská červeň

Při proměřování emisních spekter barviva RB o  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l v rozsahu 350 až 700 nm (obrázek 16) jsme registrovali emisní maxima okolo 556 nm. Excitační vlnová délka 300 nm poskytovala vyšší fluorescenční pík než excitační vlnová délka 250 nm a byla použita pro následující měření s barvivem RB. Na grafu jsou patrné vysoké píky při 600 nm a 500 nm, které odpovídají druhé harmonické (dvojnásobek excitační vlnové délky).



Obrázek 16: Emisní spektrum samotného barviva RB o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l při  $\lambda_{exc}=250$  nm (1) a  $\lambda_{exc}=300$  nm (2).  $U_F=900$  V.  $v_S=5$  nm/s.

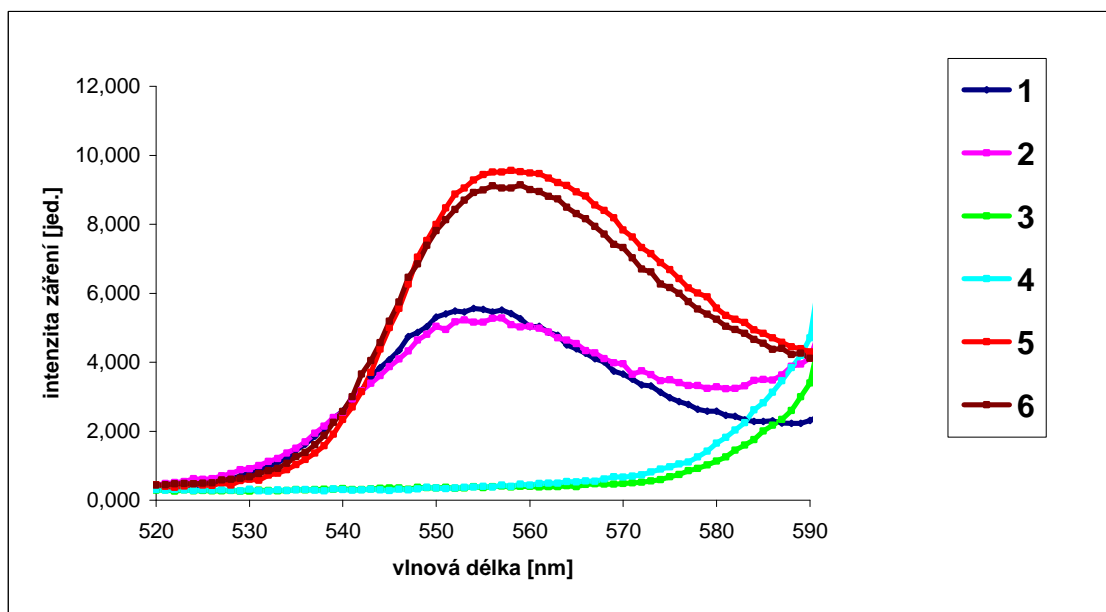
#### 4.1.4 Optimalizace experimentálních podmínek stanovení tenzidů reakcí s barvivem RB

Cílem dalších experimentů bylo vyzkoušet, jak se bude měnit intenzita fluorescenčního záření barviva se změnou pH roztoku.

Bylo připraveno 6 roztoků se stejnou koncentrací RB  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l. 3 roztoky obsahovaly Septonex o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l, další tři roztoky Septonex neobsahovaly. K sadě tvořené jedním roztokem se Septonexem a jedním bez Septonexu byl přidán malý objem roztoku HCl o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol HCl, k další sadě roztoků bylo přidáno malé množství  $1 \cdot 10^{-5}$  mol NaOH. K poslední sadě roztoků nebylo přidáno nic. Emisní spektra jednotlivých roztoků byla proměřena v intervalu 350 až 700 nm.

Po přidání HCl do sady roztoků se roztok bez Septonexu odbarvil, roztok se Septonexem se odbarvil o něco méně. Výška fluorescenčních píků se snížila na nulovou hodnotu (obrázek 17).

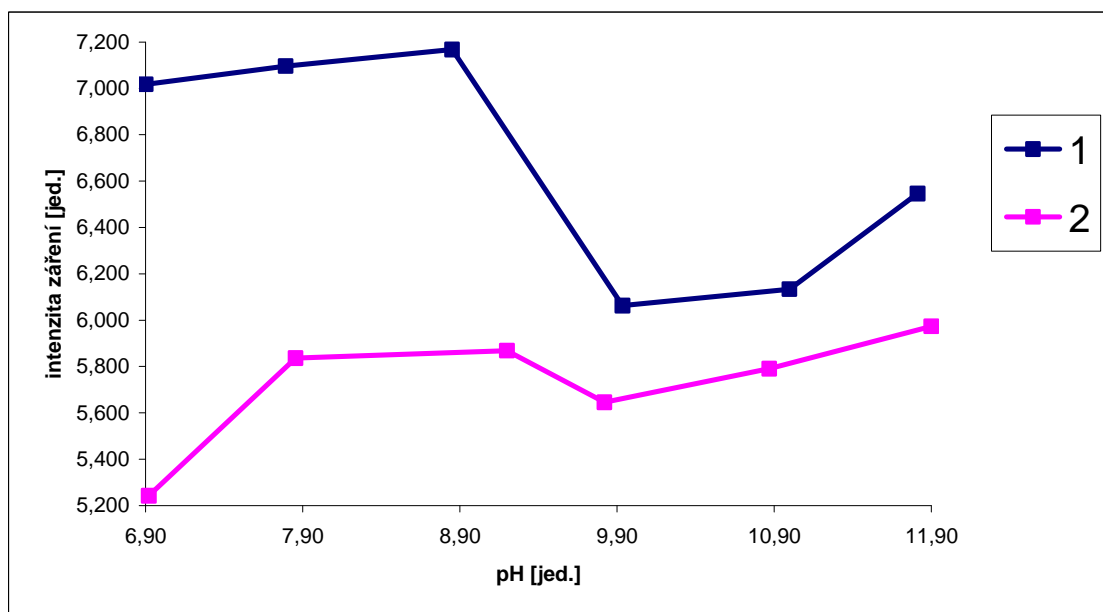
Po přidání NaOH do druhé sady roztoků roztok bez Septonexu změnil mírně barvu na růžovofialovou, roztok se Septonexem mírně zintenzívněl růžovofialové zabarvení. Výška fluorescenčních píků se značně zvýšila oproti výšce fluorescenčních píků zaznamenaných u sady roztoků bez přídavku kyseliny nebo s kyselinou.



Obrázek 17: Emisní spektrum s fluorescenčními píky barviva RB o teoretické koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  bez Septonexu (1), RB  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  se Septonexem  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  (2), RB  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  bez Septonexu s přidavkem  $10^{-5} \text{ mol HCl}$  (3), RB  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  se Septonexem  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  s přidavkem  $10^{-5} \text{ mol HCl}$  (4), RB  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  bez Septonexu s přidavkem  $10^{-5} \text{ mol NaOH}$  (5), RB  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  se Septonexem  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  s přidavkem  $10^{-5} \text{ mol NaOH}$  (6).  $\lambda_{exc}=300 \text{ nm}$ .  $U_F=900 \text{ V}$ .  $v_S=5 \text{ nm/s}$ .

Přídavek silné zásady výrazně zvýšil fluorescenci roztoku. Cílem dalších měření bylo nalézt konkrétní hodnotu pH, při níž bude dosaženo nejvyšší intenzity fluorescence roztoku RB.

Bylo připraveno v jedné sadě 6 roztoků RB o koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  bez přídavku Septonexu a 6 roztoků RB o koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  se Septonexem o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ . Přikapáváním roztoku NaOH za současného měření hodnoty pH skleněnou elektrodou pH metru bylo u každé sady přibližně nastaveno pH na hodnoty 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 a 12,0. U každého roztoku o daném pH bylo proměřeno emisní spektrum v rozsahu 350 až 700 nm a do grafu byla vynesena závislost výšky fluorescenčního píku na pH roztoku (obrázek 18).

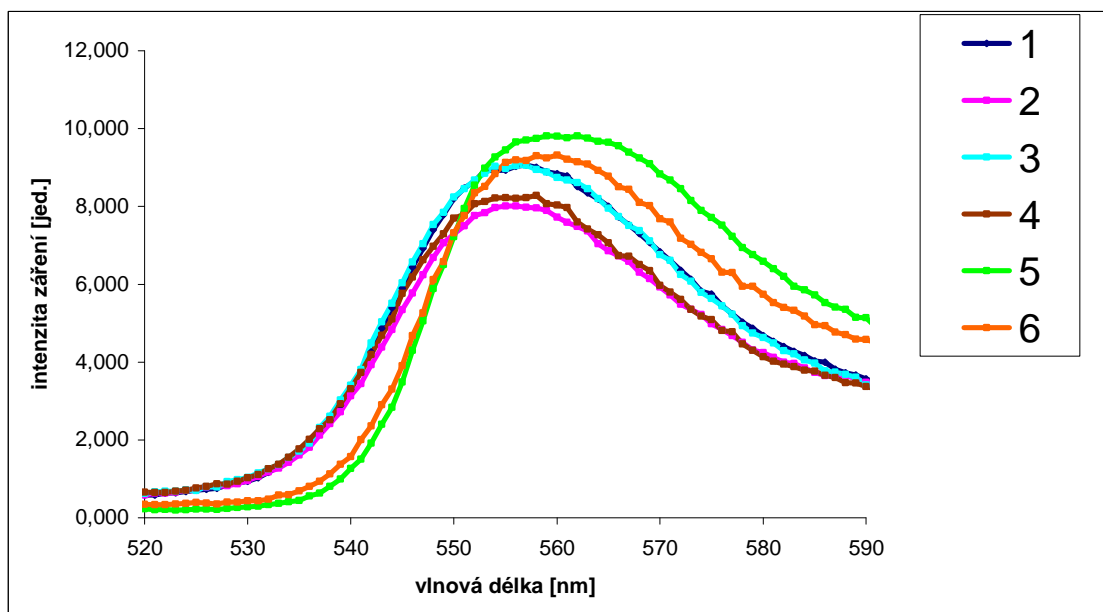


Obrázek 18: Závislost intenzity fluorescenčního záření na pH roztoku RB bez Septonexu (1) a se Septonexem (2). Ke konstrukci grafu využita emisní spektra barviva RB o teoretické koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l bez Septonexu (1) a RB  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l se Septonexem  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l (2).  $\lambda_{exc}=300$  nm.  $U_F=900$  V.  $v_S=5$  nm/s.

V grafu lze u obou průběhů závislostí pozorovat mezi pH 7,9 až 9,2 nejvyšší hodnoty výšek fluorescenčních píků. Pro tuto oblast pH je zároveň dostupný fosforečnanový pufr o pH=9,0. Pro další měření proto bylo zvoleno prostředí fosforečnanového pufru (o koncentraci  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  25 mmol/l).

Cílem dalších pokusů bylo zjistit, zda je možné provádět měření fluorescence v prostředí fosforečnanového pufru. Tedy vyzkoušet, zda se roztok tenzidu s barvivem v prostředí pufru nesráží, zjistit dlouhodobou stabilitu roztoků (přes noc v laboratoři při pokojové teplotě) a vyzkoušet chování roztoku s vyšší koncentrací RB ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l).

Při přípravě roztoků RB se Septonexem ve fosfátovém pufru nebyla pozorována tvorba sraženiny. Po přidání pufru roztoky s RB změnily zabarvení. Bylo zjištěno, že připravené roztoky barviva s tenzidem v alkalickém prostředí jsou minimálně jeden den stálé. Roztok RB o dvojnásobné koncentraci RB vykazoval vyšší fluorescenční píky (obrázek 19) a došlo k posunu maxima. Pro další měření jsme se rozhodli používat dvojnásobnou koncentraci RB  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l.



Obrázek 19: Fluorescenční píky roztoků v 25mM fosfátovém pufru o koncentraci RB  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l bez Septonexu- den1 (1), RB  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l se Septonexem  $10^{-5}$  mol/l-den1 (2), RB  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l bez Septonexu-den2 (3),  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l se Septonexem  $10^{-5}$  mol/l-den2 (4), RB  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l bez Septonexu (5), RB  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l se Septonexem  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l (6).  $\lambda_{exc}=300$  nm.  $U_F=900$  V.  $v_S=5$  nm/s.

Na grafu emisního spektra roztoků RB se Septonexem ve fosfátovém pufru lze pozorovat posun maxim fluorescenčních pásů. Pro zjištění, zda za posun maxima může proměnná koncentrace vody (vodu obsahoval dávkovaný roztok s rozpuštěným tenzidem) nebo proměnná koncentrace tenzidu, byla připravena sada roztoků s koncentrací RB  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l v pufru - jeden roztok bez přídavku vody, a další s přídavky vody (bez obsahu tenzidu) o koncentracích vody  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Změna zabarvení roztoků podle koncentrace vody nebyla pozorována, všechny roztoky byly stejně fialové. Při změření emisního spektra ( $\lambda_{exc}=300$  nm.  $U_F=900$  V.  $v_S=5$  nm/s) byly všechny fluorescenční píky stejně vysoké, posun vrcholů píků nenastal. Za posun vrcholů fluorescenčních píků může tedy přítomnost Septonexu.

#### 4.1.5 Kalibrační závislost stanovení kationaktivního tenzidu Septonex

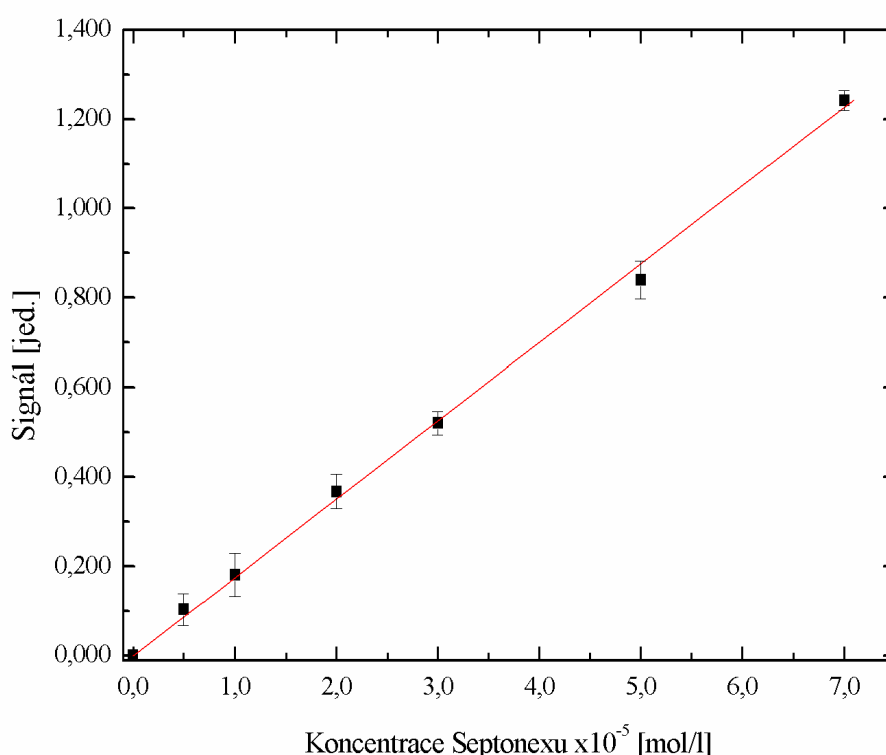
Optimální reakční podmínky byly nalezeny a bylo tedy přistoupeno k proměření kalibrační závislosti a základních charakteristik stanovení v dávkovém uspořádání.

Byla připravena sada roztoků s koncentračním rozsahem Septonexu  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $7 \cdot 10^{-5}$  mol/l v prostředí 25 mM fosfátového pufru a s koncentrací RB  $5 \cdot 10^{-5}$

mol/l. Byla proměřena emisní spektra těchto roztoků ( $\lambda_{\text{exc}}=300$  nm.  $U_F=900$  V.  $v_S=5$  nm/s). Z proměřených spekter byla sestrojena kalibrační závislost. Hodnota výšky pásu v emisním spektru pro roztok s danou koncentrací tenzidu byla vždy odečtena od výšky pásu roztoku bez tenzidu (slepý pokus) a tyto hodnoty byly po vynásobení konstantou (-1) vynášeny na osu y kalibrační závislosti.

Rovnice kalibrační přímky byla:  $y = 0,0368 + 16684x$

Roztok Septonexu o koncentraci  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/l již nedával měřitelnou odezvu.



Obrázek 20: Kalibrační graf-závislost výše signálu na koncentraci Septonexu v prostředí 25 mM fosfátového pufru

#### 4.1.6 Základní charakteristiky vyvíjené metody stanovení Septonexu v dávkovém uspořádání

*Citlivost* vyjádřená jako směrnice kalibrační přímky má hodnotu  $16684 \text{ mol}^{-1}$ .

*Lineární dynamický rozsah* kalibrace činí  $3,72 \cdot 10^{-6} - 7 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ . Dolní mez intervalu představuje mez stanovitelnosti, horní mez intervalu byly experimentálně určena při kalibraci metody.



*Opakovatelnost* vyjádřená jako relativní chyba měření činí 2,26 %.

*Mez detekce* ( $3\sigma$  kritérium) má hodnotu  $1,12 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

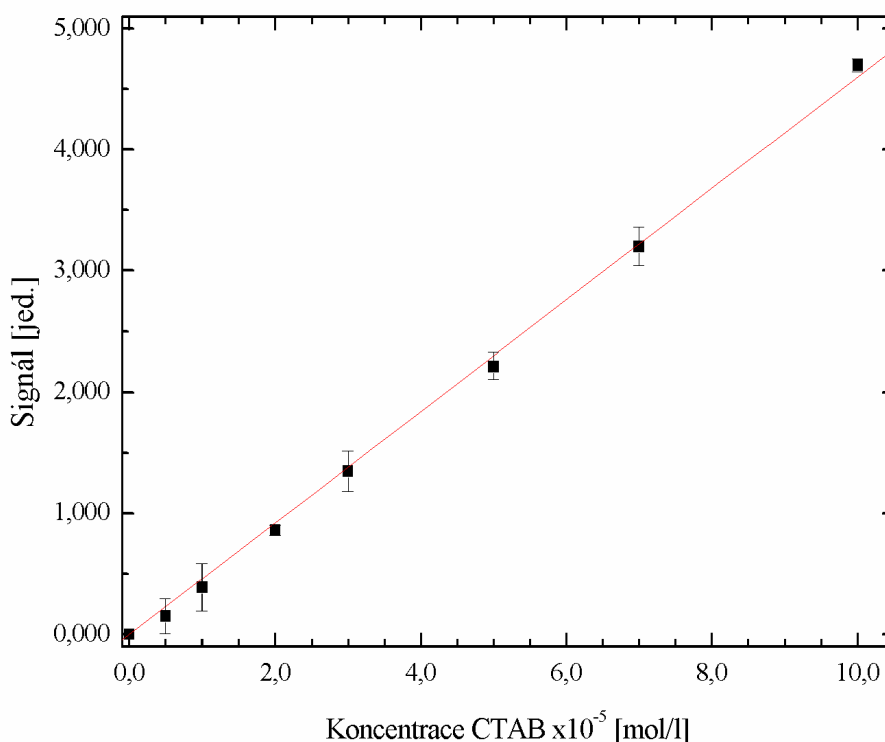
*Mez stanovitelnosti* ( $10\sigma$  kritérium) má hodnotu  $3,72 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

#### 4.1.7 Kalibrační závislost stanovení kationaktivního tenzidu CTAB

Podobně jako při stanovení Septonexu, byla proměřena kalibrační závislost stanovení kationaktivního tenzidu CTAB. Byly použity optimální podmínky zjištěné při optimalizaci se Septonexem.

V koncentračním rozsahu CTAB  $5 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v prostředí 25 mM fosfátového pufru s koncentrací RB  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l byla proměřena emisní spektra směsných roztoků určených ke kalibraci ( $\lambda_{\text{exc}}=300$  nm.  $U_F=900$  V.  $v_S=5$  nm/s). Na základě výšek fluorescenčních píků v závislosti na koncentraci CTAB byl sestaven kalibrační graf (graf byl konstruován stejným způsobem jako v případě stanovení Septonexu).

Rovnice kalibrační přímky byla:  $y = -0,0186 + 44003 x$



*Obrázek 21: Kalibrační graf-závislost výše signálu na koncentraci CTAB v prostředí 25 mM fosfátového pufru.*

Směrnice kalibrační přímky dosahuje u CTAB znatelně vyšších hodnot než v případě Septonexu. Stanovení CTAB by tedy bylo znatelně citlivější a vyvíjenou metodu v dávkovém uspořádání tedy nelze použít pro současné stanovení Septonexu a CTAB ve směsi (a pro stanovení směsi kationaktivních tenzidů obecně). Při vyšších koncentracích CTAB byl pozorován výraznější posun vrcholů fluorescenčních pásů.

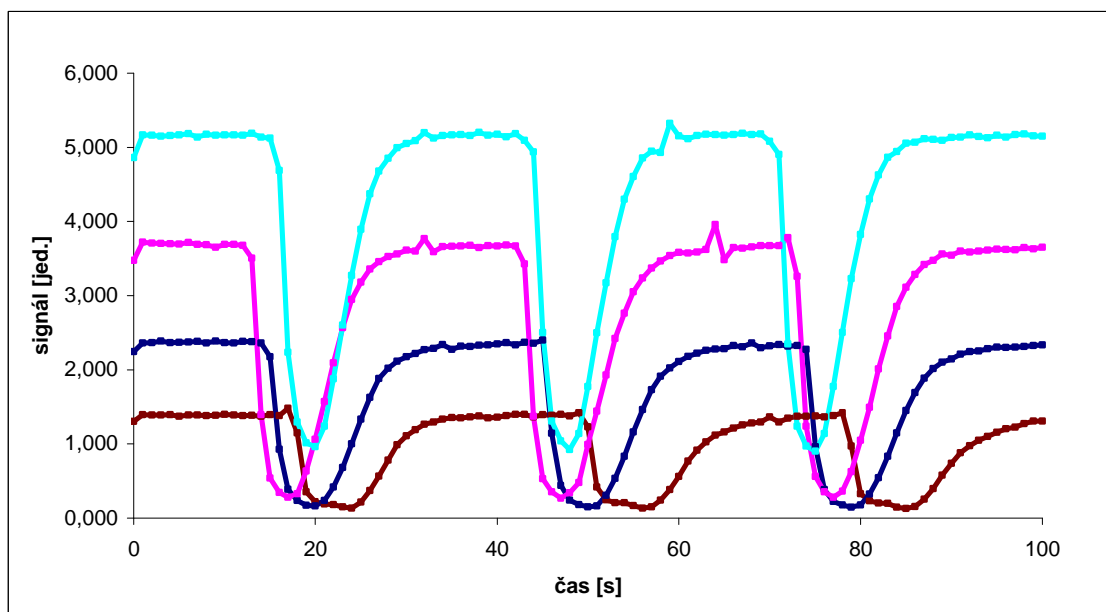
#### **4.2 Průtokové stanovení kationaktivních tenzidů**

Pro metodu průtokového stanovení kationaktivních tenzidů bylo použito dvoukanálového uspořádání aparatury pro FIA (popis aparatury se nachází v kapitole 3.4). V jednom kanálu proudila deionizovaná voda, v druhém barvivo RB ve fosfátovém pufru. Do kanálu s destilovanou vodou byl dávkován roztok tenzidu.

Původně bylo zkoušeno i jednokanálové zapojení, kdy tenzid byl dávkován přímo do proudu barviva. V tomto případě dávala pozitivní hodnotu i samotná voda (rozředění barviva rozpouštědlem), proto toto jednodušší uspořádání nebylo použitelné.

S ohledem na chemickou odolnost plastových hadiček aparatury bylo nutné použít pro RB jiné rozpouštědlo než směs methanolu s vodou. V tomto případě tedy bylo barvivo přímo rozpuštěno v 25 mM fosfátovém pufru (koncentrace  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l).

Příslušný FIA záznam má charakter závislosti intenzity fluorescenčního záření snímaného kontinuálně v čase při nastavené vlnové délce excitačního (300 nm) a emisního maxima (560 nm). Základní linie odpovídá signálu rozředěného barviva RB proudícího detektorem. Pokud je do aparatury nadávkován tenzid, dojde ke vzniku iontového asociátu a k poklesu signálu fluorescence, který se projeví charakteristickým inverzním FIA píkem. Ve všech případech byla odečítána výška píku jako rozdíl ypsilonové souřadnice základní linie a ypsilonové souřadnice vrcholu píku, a v této formě dále porovnávána.



Obrázek 22: Ukázka záznamu detektoru při měření FIA. Obrázek zachycuje růst hodnoty základní linie fluorescenčního signálu a změnu tvaru a výšky fluorescenčních píků při zvýšení koncentrace RB

.

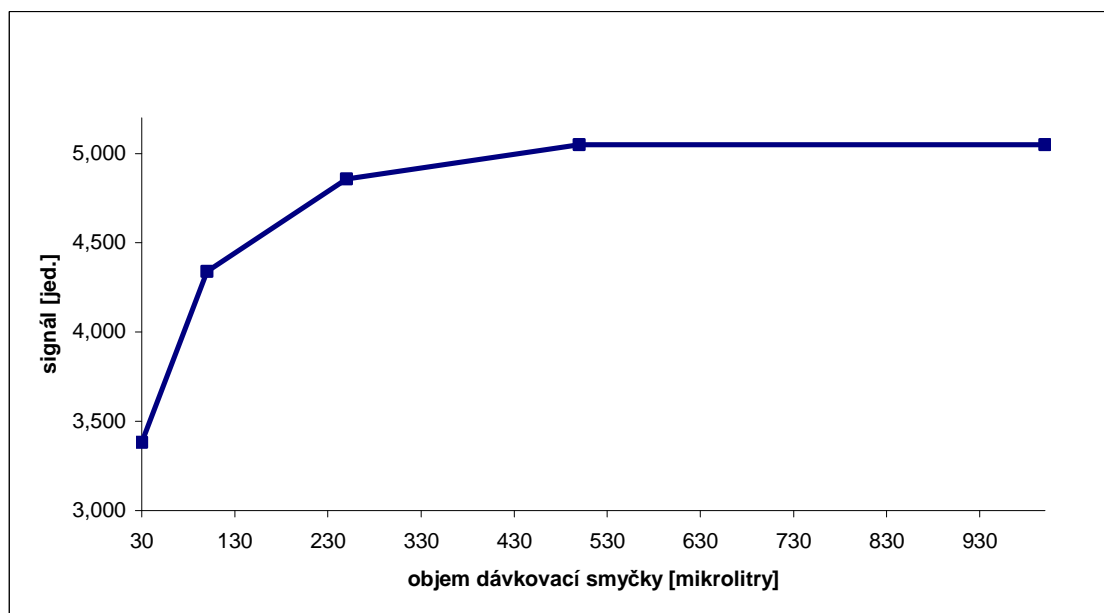
#### 4.2.1 Optimalizace průtokových experimentálních podmínek stanovení

Pro optimalizaci podmínek měření byl zvolen s ohledem na vyšší citlivost roztok tenzidu CTAB o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Při měřeních byla vždy použita excitační vlnová délka 300 nm, fluorescenční signál byl snímán při emisní vlnové délce 560 nm. Snímání trvalo vždy 100 s, signál byl vzorkován v intervalu jedné sekundy. Koncentrace RB v 25mM fosfátovém pufru byla vždy  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l, měněna byla pouze při sledování vlivu koncentrace barviva na intenzitu signálu.

Při optimalizaci průtokových rychlostí byly ověřeny skutečné průtokové rychlosti peristaltických pump objemovou metodou.

### 4.2.2 Objem dávkovaného vzorku

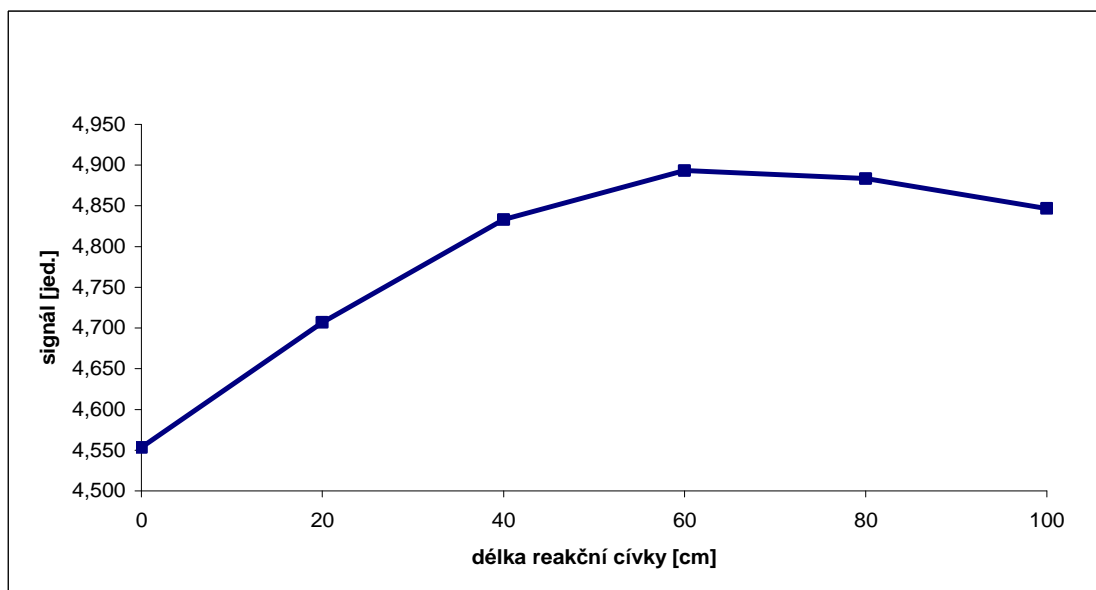
V aparatuře FIA byly postupně měněny dávkovací smyčky dávkovacího ventilu, vždy se vyhodnocovala výška FIA píků a jejich tvar. Byly testovány následující dávkované objemy 30  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$  a 1000  $\mu\text{l}$ . Na základě dosažené citlivosti a zároveň míry dosažené disperze byla vybrána jako optimální 250  $\mu\text{l}$  dávkovací smyčka.



Obrázek 23: Závislost výšky FIA píků na objemu dávkovací smyčky. Délka reakční cívky  $L_C = 80 \text{ cm}$ .  $v_{FSV} = 3,1 \text{ ml/min}$ .  $U_F = 800 \text{ V}$ .

### 4.2.3 Optimalizace délky reakční cívky

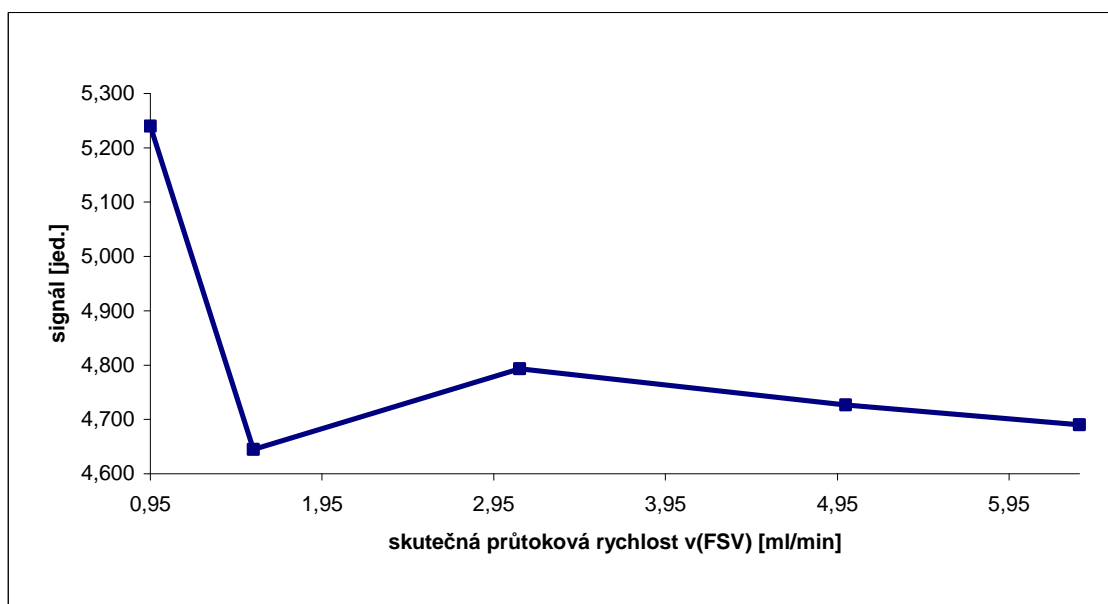
Při optimalizaci byly vyzkoušeny reakční cívky délek 0 cm (tvořené pouze rovným vedením s vynechanou cívkou), 20 cm, 40 cm, 60 cm, 80 cm a 100 cm. Z připojené závislosti je vidět, že reakční cívku je potřeba do obvodu zapojit a to nejlépe v délce 60 cm. Při použití delších cívek již převládne disperze nadávkoované zóny nad účinností promíchání.



Obrázek 24: Závislost výšky FIA píků na délce reakční cívky. Objem dávkovací smyčky  $V_S = 250 \mu\text{l}$ .  $v_{FSV} = 3,1 \text{ ml/min}$ .  $U_F = 800 \text{ V}$ .

#### 4.2.4 Optimalizace průtokové rychlosti obou kanálů

Na peristaltické pumpě Masterflex udržující konstantní průtok v obou kanálech, byly postupně nastaveny následující průtokové rychlosti 0,95; 1,55; 3,1; 5 a 6,36 ml/min. Na základě vyhodnocení dosažených FIA píků byla pro další měření vybrána jako optimální průtoková rychlost 3,1 ml/min jako kompromis mezi dosaženou citlivostí a rychlostí analýzy.

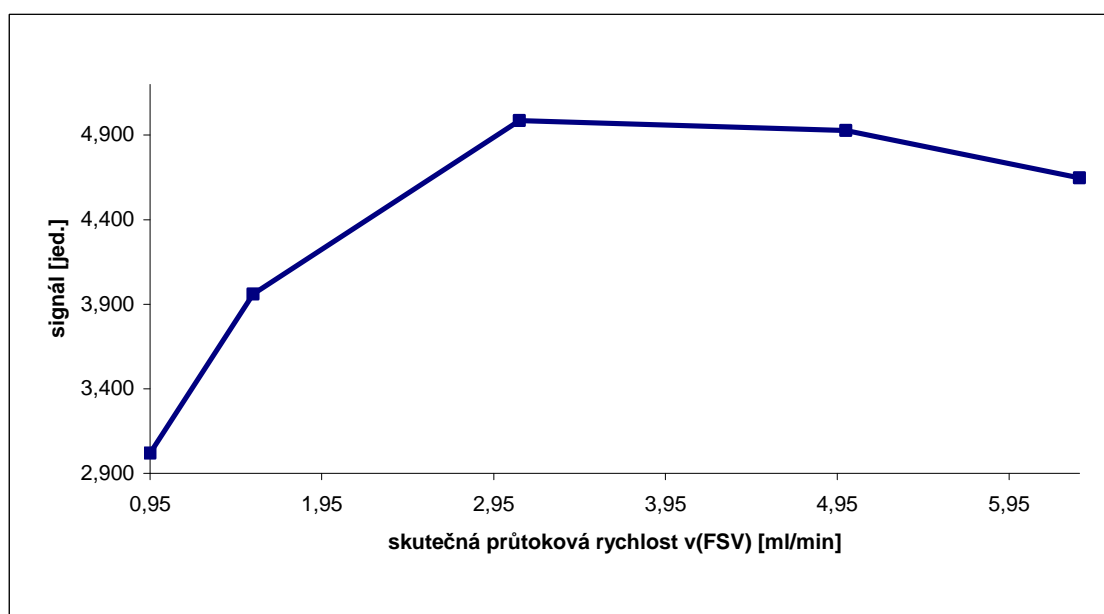


Obrázek 25: Závislost výšky FIA píků na skutečné průtokové rychlosti pumpy Masterflex.  $L_C = 60 \text{ cm}$ .  $V_S = 250 \mu\text{l}$ .  $U_F = 800 \text{ V}$ .

#### 4.2.5 Optimalizace jednotlivých průtokových rychlostí kanálů

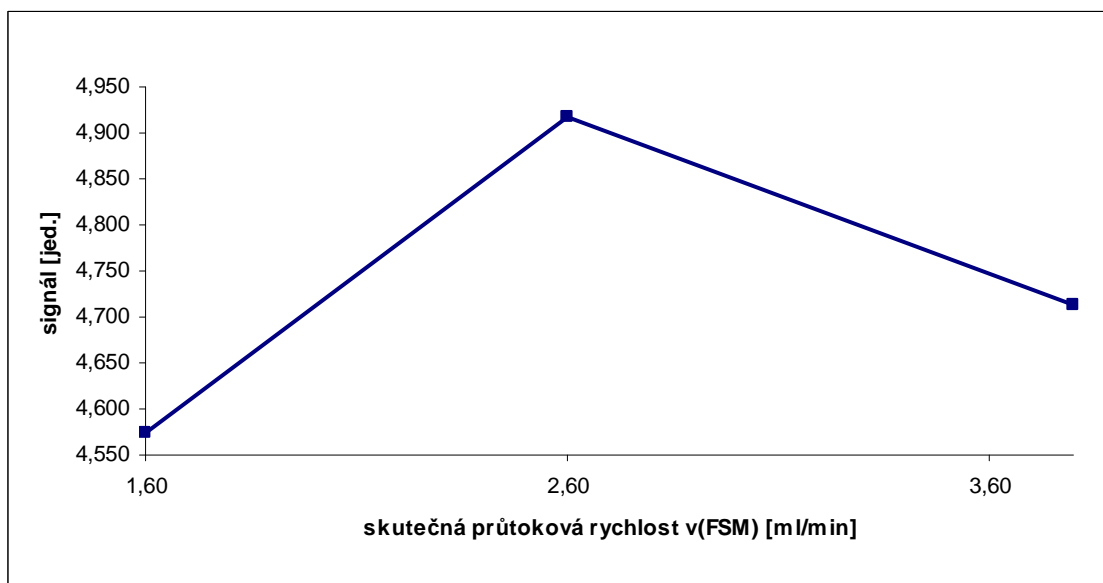
V tomto případě byla pro zajištění toku v kanálu s deionizovanou vodou použita peristaltická pumpa Masterflex, a pro zajištění toku v kanálu s barvivem Bengálská červeň a fosfátovým pufrům byla použita peristaltická pumpa C.P. 78017-20.

Nejprve byla nastavena konstantní rychlost průtoku u pumpy C.P. 78017-20 na hodnotu 2,6 ml/min a měnila se hodnota průtoku dodávaného pumpou Masterflex. Byly vyzkoušeny následující průtokové rychlosti 0,95; 1,55; 3,1; 5,0 a 6,36 ml/min. Nejvyšší výška FIA píků byla zjištěna při průtoku 3,1 ml/min.



Obrázek 26: Závislost výšky FIA píků na průtokové rychlosti pumpy Masteflex.  $v_{FSM} = 2,6 \text{ ml/min}$ .  $L_C = 60 \text{ cm}$ .  $V_S = 250 \mu\text{l}$ .  $U_F = 800 \text{ V}$ .

V další fázi byla na pumpě Masterflex nastavena konstantní průtoková rychlost 3,1 ml/min. Na pumpě C.P. 78017-20 byly postupně nastaveny průtokové rychlosti 1,6; 2,6; a 3,8 ml/min. Nejvyšší hodnoty FIA píků bylo dosaženo při průtokové rychlosti 2,6 ml/min).

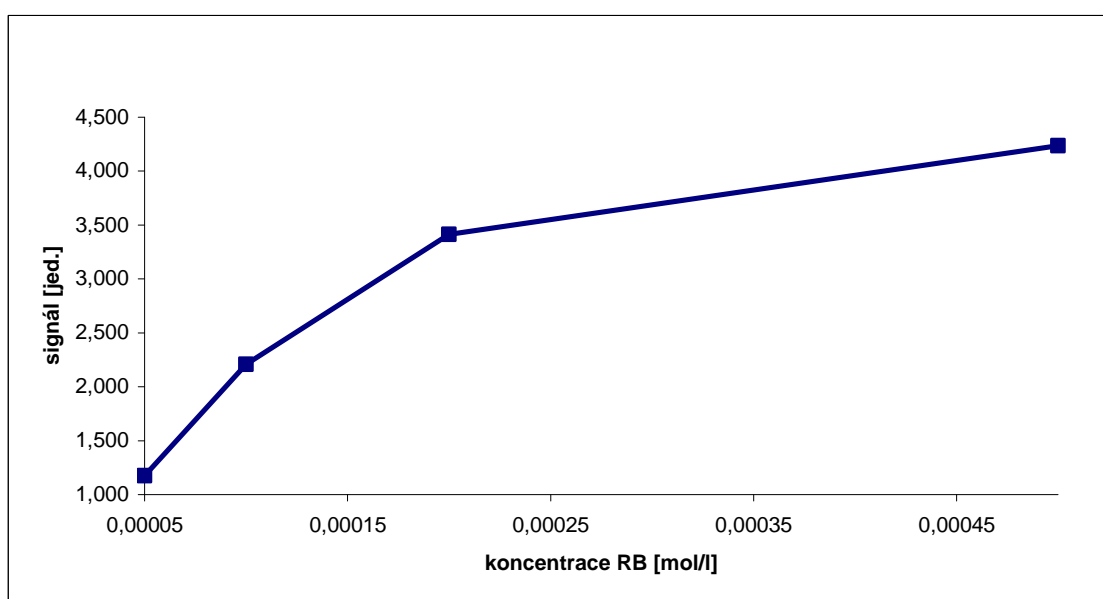


Obrázek 27: Závislost výšky FIA píků na průtokové rychlosti pumpy C.P.78017-20.

$v_{FSV} = 3,97 \text{ ml/min}$ .  $L_C = 60 \text{ cm}$ .  $V_S = 250 \mu\text{l}$ .  $U_F = 800 \text{ V}$ .

#### 4.2.6 Vliv koncentrace RB v pufru

Pro proměření závislosti byly připraveny roztoky RB v 25 mM fosfátovém pufru o následujících koncentracích barviva:  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ ,  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ ,  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$  a  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ . Vyhodnocením proměřených FIA záznamů bylo určeno, že pro další pokusy bude optimální používat koncentraci RB  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ .



Obrázek 28: Závislost výšky FIA píků na koncentraci RB v pufru.  $v_{FSV} = 3,1 \text{ ml/min}$ .

$v_{FSM} = 2,6 \text{ ml/min}$ .  $L_C = 60 \text{ cm}$ .  $V_S = 250 \mu\text{l}$ .  $U_F = 800 \text{ V}$ .

#### 4.2.7 Výsledné optimální podmínky pro FIA stanovení kationaktivních tenzidů

Délka reakční cívky .....	60 cm
Objem dávkovaného vzorku .....	250 µl
Průtoková rychlost pumpy Masterflex (kanál s deionizovanou vodou) .....	3,1 ml/min
Průtoková rychlost pumpy C.P. 78017-20 (kanál s RB ve fosfátovém pufru).....	2,6 ml/min
Koncentrace RB v 25mM fosfátovém pufru.....	$5 \cdot 10^{-4}$ mol/l

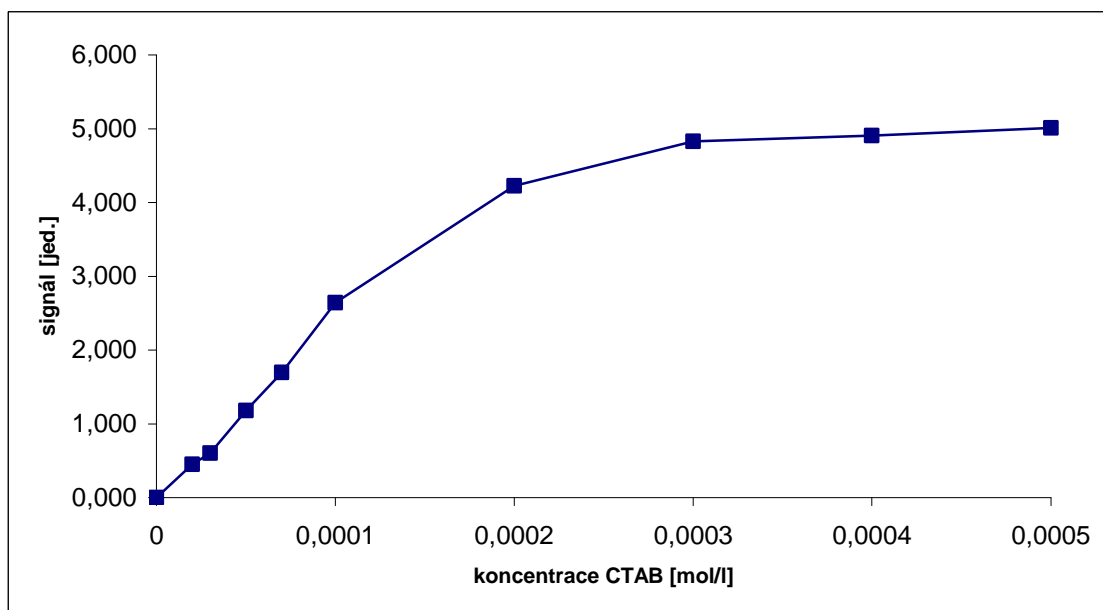
Zjištěné optimální podmínky pro FIA stanovení byly použity při kalibraci a zjištění základních parametrů FIA stanovení. Při měřeních byla vždy použita excitační vlnová délka 300 nm, fluorescenční signál byl snímán při emisní vlnové délce 560 nm. Snímání trvalo vždy 100 s, intenzita fluorescence byla měřena vždy každou sekundu.

#### 4.2.8 Kalibrační závislost stanovení CTAB

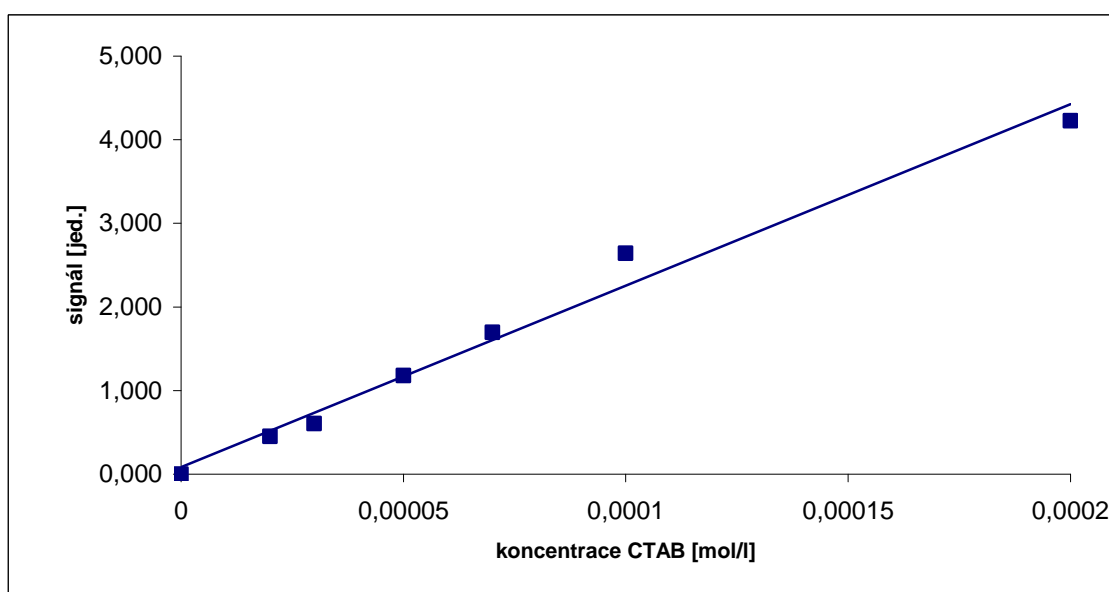
Na základě měření výšky FIA píků na koncentraci CTAB byla sestrojena níže uvedená kalibrační závislost. Byly proměřeny roztoky CTAB o koncentraci  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l až  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Roztok o koncentraci  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l již neposkytoval při použitém napětí na fotonásobiči žádný měřitelný signál. Studovaná závislost byla lineární v intervalu koncentrací  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. U dalších měření pro sestrojení kalibračního grafu bylo použito s ohledem na dosaženou citlivost vyšší napětí na fotonásobiči.

Lineární část závislosti lze popsat rovnicí:  $y = 0,0856 + 21705x$





Obrázek 29: Kalibrační závislost stanovení CTAB.  $v_{FSV} = 3,1$  ml/min.  $v_{FSM} = 2,6$  ml/min.  $L_C = 60$  cm.  $V_S = 250$   $\mu$ l.  $U_F = 800$  V.



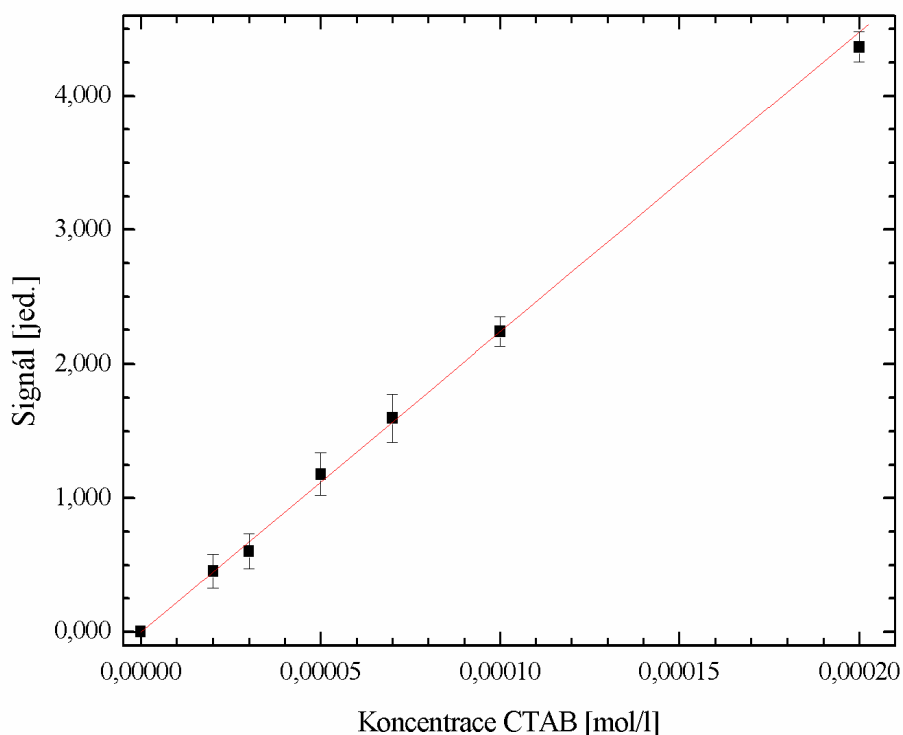
Obrázek 30: Lineární část kalibrační závislosti stanovení CTAB.  $v_{FSV} = 3,1$  ml/min.  $v_{FSM} = 2,6$  ml/min.  $L_C = 60$  cm.  $V_S = 250$   $\mu$ l.  $U_F = 800$  V.

#### 4.2.9 Kalibrační závislost stanovení CTAB (vyšší napětí na fotonásobiči)

Ke konstrukci kalibračního grafu stanovení CTAB byly použity vodné roztoky CTAB v koncentračním rozsahu  $10^{-5}$  mol/l až  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Pro dosažení vyšší citlivosti

bylo použita na fotonásobiči vyšší hodnota napětí (850 V). Hodnota směrnice kalibrační přímky oproti předchozímu měření (napětí na fotonásobiči 800 V) vzrostla.

Hodnota nové rovnice kalibrační přímky:  $y = -0,0121 + 36752x$



Obrázek 31: Kalibrační závislost stanovení CTAB.  $v_{FSV} = 3,1 \text{ ml/min.}$   $v_{FSM} = 2,6 \text{ ml/min.}$   $L_C = 60 \text{ cm}$   $V_S = 250 \text{ } \mu\text{l.}$   $U_F = 850 \text{ V.}$

#### 4.2.10 Základní charakteristiky stanovení CTAB v průtokovém uspořádání FIA

*Citlivost* vyjádřená jako směrnice kalibrační přímky má hodnotu  $36752 \text{ mol}^{-1}\text{l.}$

*Lineární dynamický rozsah* kalibrace činí  $5,41 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l.}$  Dolní mez intervalu představuje mez stanovitelnosti, horní mez intervalu byla experimentálně určena při kalibraci metody.

*Opakovatelnost* vyjádřená jako relativní chyba měření činí  $1,20 \text{ } \%$ .

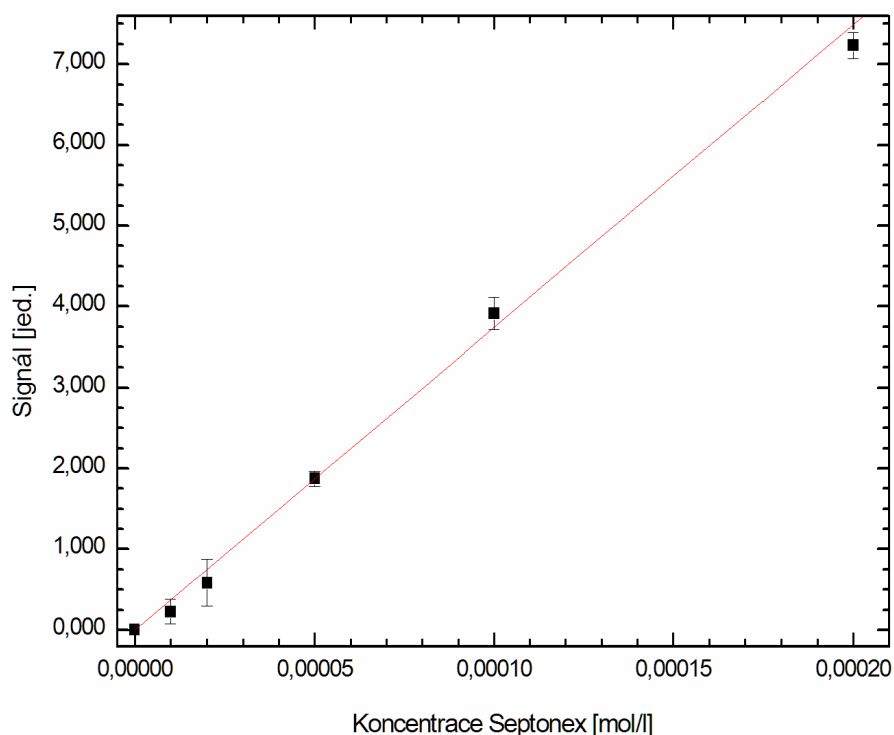
*Mez detekce* ( $3 \sigma$  kritérium) má hodnotu  $1,62 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l.}$

*Mez stanovitelnosti* ( $10 \sigma$  kritérium) má hodnotu  $5,41 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l.}$

#### 4.2.11 Kalibrační závislost stanovení Septonexu ve FIA uspořádání

Ke konstrukci kalibračního grafu Septonexu byly použity vodné roztoky Septonexu v koncentračním rozsahu  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l až  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l.

Hodnota rovnice kalibrační přímky:  $y = 0,0676 + 36955x$



Obrázek 32: Kalibrační závislost stanovení Septonexu.  $v_{FSV} = 3,1$  ml/min.  $v_{FSM} = 2,6$  ml/min.  $L_C = 60$  cm  $V_S = 250$   $\mu$ l.  $U_F = 850$  V.

#### 4.2.12 Základní charakteristiky stanovení Septonexu v průtokovém uspořádání FIA

*Citlivost* vyjádřená jako směrnice kalibrační přímky má hodnotu  $36955 \text{ mol}^{-1}$ l.

*Lineární dynamický rozsah* kalibrace činí  $9,26 \cdot 10^{-6}$  -  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Dolní mez intervalu představuje mez stanovitelnosti, horní mez intervalu byla experimentálně určena při kalibraci metody.

*Opakovatelnost* vyjádřená jako relativní chyba měření činí 2,06 %.

*Mez detekce* (3  $\sigma$  kritérium) má hodnotu  $2,78 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

*Mez stanovitelnosti* (10  $\sigma$  kritérium) má hodnotu  $9,26 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

Směrnice obou kalibračních přímek se v případě FIA stanovení kationaktivních tenzidů téměř shodují. Tento jev je příznivý pro obecné stanovení směsi kationaktivních tenzidů metodou FIA v neznámém vzorku.

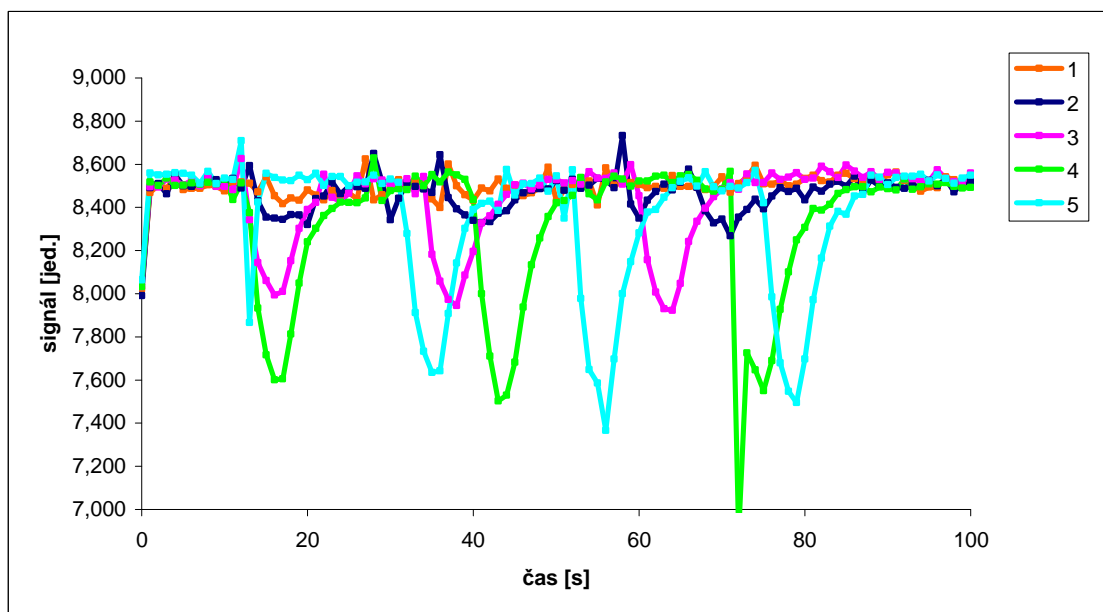
#### **4.3 Stanovení koncentrace kationaktivních tenzidů v pitné vodě metodou FIA**

Jako vzorek byla použita pitná voda odebraná na katedře analytické chemie PřF UK. U tohoto vzorku obsahujícího pouze pitnou vodu nebyl po nadávkování do aparatury zaznamenán žádný signál. Zaznamenaná byla pouze hodnota šumu (*obrázek 33*). Z odebraných vzorků byly dále připraveny spikované vzorky s přidavkem CTAB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l,  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Pro měření byly použity optimalizované experimentální podmínky.

U spikovaného vzorku s koncentrací CTAB  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l nebyly přes přidavek tenzidu rovněž zaznamenány žádné použitelné píky. Zaznamenán byl pouze zvýšený šum.

U spikovaného vzorku s koncentrací CTAB  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l byly zaznamenány píky na pozadí se šumem. Zaznamenaná výška FIA píků je však nižší než hodnota, která podle kalibračního grafu přísluší hodnotě roztoku CTAB o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l v deionizované vodě.

U spikovaného vzorku s koncentrací CTAB  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l byly zaznamenány při opakovaném měření píky na pozadí s šumem. Zaznamenaná výška FIA píků je opět nižší než hodnota, která podle kalibračního grafu přísluší hodnotě roztoku CTAB o koncentraci  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l v deionizované vodě.



Obrázek 33: Záznam z fluorescenčního detektoru při stanovení koncentrace kationaktivních tenzidů v pitné vodě. Záznam pitné vody (1), pitná voda s koncentrací CTAB  $10^{-5}$  mol/l (2), pitná voda s koncentrací CTAB  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l (3), pitná voda s koncentrací CTAB  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l – první měření (4), pitná voda s koncentrací CTAB  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l – druhé měření (5).  $v_{FSV} = 3,1$  ml/min.  $v_{FSM} = 2,6$  ml/min.  $L_C = 60$  cm  $V_S = 250$   $\mu$ l.  $U_F = 850$  V.

Po přepočtu zjištěného signálu (čisté výšky píků) přes rovnici kalibrační přímky na koncentraci CTAB dojdeme k nižší hodnotě koncentrace tenzidu, než je výchozí koncentrace přídatku CTAB.

Toto může být způsobeno např. přednostní tvorbou komplexů kationtu kationaktivních tenzidů s anionty nacházejícími v pitné vodě. Kationty tenzidů pak již nejsou schopné tvořit asociáty s reagentem a snižovat tak fluorescenci samotného barviva. Mohlo by se jednat například o rušivý vliv anionaktivních tenzidů.

Pro stanovení kationaktivních tenzidů ve vzorcích s reálnou matricí bude tedy nutné nejdříve tenzidy ze směsi vhodnou metodou separovat.

## 5. Závěr

Předkládaná diplomová práce je věnována vývoji metody citlivého stanovení kationaktivních tenzidů metodou průtokové injekční analýzy s fluorimetrickou detekcí.

V první fázi práce bylo nejprve vyzkoušeno při sérii statických měření barvivo Bengálská červeň, které poskytovalo vhodný základ pro dosažení lineární závislosti signálu fluorescence na koncentraci kationaktivních tenzidů. Při dalších měřeních se podařilo nalézt optimální pH a nalézt vhodný pufr pro prostředí reakce tvorby asociátů s barvivem Bengálská červeň. Byla provedena kalibrace na kationaktivní tenzidy Septonex a CTAB a určeny základní charakteristiky vyvíjené metody stanovení při dávkové metodě stanovení septonexu. Lineární dynamický rozsah kalibrace septonexu činí  $3,72 \cdot 10^{-6}$  -  $7 \cdot 10^{-5}$  mol/l.

Další fáze práce byla zaměřena na vývoj metody stanovení pro průtokovou injekční metodu. Byla navržena a sestavena aparatura pro průtokovou injekční analýzu a určeno vhodné složení a koncentrace látek dodávaných kanály aparatury. Při optimalizačních měřeních byly nalezeny vhodné parametry základních částí aparatury- velikost dávkovaného objemu, délka reakční cívky, optimální průtoková rychlost obou kanálů a byla ověřena optimální koncentrace barviva RB. Byla proměřena kalibrační závislost stanovení septonexu i CTAB. Zjištěný lineární dynamický rozsah kalibrace septonexu činí  $9,26 \cdot 10^{-6}$  -  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Zjištěný lineární dynamický rozsah kalibrace CTAB činí  $5,41 \cdot 10^{-6}$  -  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Dále byly určeny základní charakteristiky vyvíjené metody v průtokovém uspořádání. U obou druhů tenzidů bylo dosaženo stejné citlivosti.

V poslední fázi práce byly proměřeny CTAB spikované vzorky vodovodní pitné vody s cílem zjistit koncentraci kationaktivních tenzidů v pitné vodě. U spikovaných vzorků byl registrován zvýšený šum a snížení signálu odpovídajícího úbytku účinné formy tenzidů. Experiment prokázal, že vyvíjená metoda vyžaduje pro spolehlivé měření nejprve separaci kationaktivních tenzidů od matrice vzorku.

## 6. Seznam použitých zdrojů

- (1) Harvey D. (2000): Modern Analytical Chemistry. De Pann University. Mc Graw-Hill Companies, Inc. USA.
- (2) Lakowicz, J. R. (1999): Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kluwer Academic/Plenum Publisher. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
- (3) Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P. (2004): Spektrometrické analytické metody I. Univerzita Karlova v Praze. Nakladatelství Karolinum. Praha.
- (4) Atkins P. (2006): Atkins' Physical Chemistry. Oxford University Press. W. H. Freeman and Company. USA..
- (5) Gauglitz G., Vo-Dinh T. (2003): Handbook of Spectroscopy. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim.
- (6) Bowen E. J., Wokes F. (1953): Fluorescence of Solutions. Longmas, Green and Co. London, New York, Toronto.
- (7) Němcová et al. (1998): Spektrometrické analytické metody II. Univerzita Karlova v Praze. Nakladatelství Karolinum. Praha.
- (8) Vávrova J.: Laserem indukovaná fluorescence.  
[http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS3/hypertext/JVAAZ.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/JVAAZ.htm) [cit. 10.12.2009]
- (9) Kessler M. A, Wolfbeis O. S. (1992): Laser-induced fluorometric determination of albumin using longwave absorbing molecular probes. Analytical Biochemistry Volume 200, Issue 2, 254-259.
- (10) Hinton E. R., White L.E. (1981): Applications of Laser-Induced Fluorometry to the Analysis of Ultratrace Levels of Uranium in an Industrial Environment. Analytical Letters Volume 14, Issue 12, 947-958.
- (11) Wehry E. L. (1981): Modern Fluorescence Spectroscopy, Volume 3. Plenum Press. New York.
- (12) Porter N. et al. (1995): Determination of metal ion mixtures using pH gradient flow-injection analyses with fluorescence detection. Analytica Chimica Acta 308, 313-328.
- (13) Wehry E. L. (1981): Modern Fluorescence Spectroscopy, Volume 4. Plenum Press. New York.
- (14) Welz B., Sperling M. (1999): Atomic Absorption Spectrometry, 3rd ed. Wiley Verlag GmbH. Weinheim.

- (15) Reichl J., Všetická M.: Samostatný výboj v plynu za atmosférického a za sníženého tlaku.  
<http://fyzika.jreichl.com/index.php?sekce=browse&page=283> [cit. 18.9.2011]
- (16) Šmidrkal J. (1999): Tenzidy a detergenty dnes. Chemické listy 93, 421-427.
- (17) Bartovská L., Šišková M.: Co je co v povrchové a koloidní chemii.  
[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/ebook.help.htm](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/ebook.help.htm) [cit. 16.8.2012]
- (18) Bartuška K., Svoboda E (1993): Molekulová fyzika a termika. Galaxie. Praha.
- (19) Hally J.: Prací prostředky, životní prostředí a environmentální výchova. Karlova univerzita.  
<http://www.csdpa.cz/prednaskyaskriptaCZ.htm> [cit. 22.8.2007]
- (20) Zýka J. et al. (1988): Nové směry v analytické chemii. SNTL-Nakladatelství technické literatury. Praha.
- (21) Paseková H., Polášek P., Solich P.(1999): Sekvenční injekční analýza. Chemické listy 93, 354-359.
- (22) Zhang RuiQui et al. (2005): Sequential chemiluminescence immunoassay for anionic surfactants using magnetic microbeads immobilized with antibody. Talanta 68, 231-238.
- (23) Zhang RuiQui et al.(2007): Sequential Injection chemiluminescence Immunoassay for nonionic surfactants by using magnetic microbeads. Analytica Chimica Acta 600, 105-113.
- (24) Opekar F. et al. (2010): Základní analytická chemie, 2. vydání. Univerzita Karlova v Praze. Nakladatelství Karolinum. Praha.
- (25) Mohamed Gehad G. et al. (2011): Septonex-tetraphenylborate screen-printed ion selective electrode for the potentiometric determination of Septonex in pharmaceutical preparations. ANALYST Volume 136, Issue 7, 1488-1495.
- (26) Štulík K. et al. (2004): Analytické separační metody. Univerzita Karlova v Praze. Nakladatelství Karolinum. Praha.
- (27) Opekar F. et al. (2002): Základní analytická chemie. Univerzita Karlova v Praze. Nakladatelství Karolinum. Praha.
- (28) Belmont M. A., Metcalfe Ch. D. (2003): Feasibility of using ornamental plants (*Zantedeschia aethiopica*) in subsurface flow treatment wetlands to remove nitrogen, chemical oxygen demand and nonylphenol ethoxylate surfactants – a laboratory scale study. Ecological Engineering 21, 233 – 247.



- (29) Belmont M. A. et al. (2006): Presence of nonylphenol ethoxylate surfactants in a watershed in central Mexico and removal from domestic sewage in a treatment wetland. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 29-35.
- (30) Havelka M. (2008): Účinnost odbourávání anionaktivních tenzidů ve vegetačním poli umělého mokřadu. Bakalářská práce. Fakulta přírodovědecká. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.